Biochemische Zeitschrift

Unter Mitwirkung von

M. Ascoli-Catania, **L. Asher**-Bern, **M. Bergmann**-Dresden, **G. Bertrand**-Paris, **A. Bickel**-Berlin, **F. Blumenthal**-Berlin, **A. Bonanni**-Rom, **F. Bottazzi**-Neapel, **G. Bredig**-Karlsruhe i. B., **R. Doerr**-Basel, **A. Durig**-Wien, **F. Ehrlich**-Breslau, **H. v. Euler**-Stockholm, **S. Flexner**-New York, **J. Forssman**-Lund, **S. Fränkel**-Wien, **E. Freund**-Wien, **H. Freundlich**-Berlin-Dahlem, **E. Friedberger**-Greifswald, **E. Friedmann**-Berlin, **E. Fromm**-Wien, **O. Fürth**-Wien, **F. Haber**-Berlin-Dahlem, **M. Hahn**-Berlin, **H. J. Hamburger**-Groningen, **P. Hári**-Budapest, **F. Hayduck**-Berlin, **E. Hägglund**-Abo, **A. Heffter**-Berlin, **V. Henri**-Paris, **V. Henriques**-Kopenhagen, **R. O. Herzog**-Berlin-Dahlem, **K. Hess**-Berlin-Dahlem, **W. Heubner**-Göttingen, **R. Höber**-Kiel, **M. Jacoby**-Berlin, **P. Karrer**-Zürich, **M. Kochmann**-Halle a. S., **F. Landolf**-Buenos Aires, **L. Langstein**-Berlin, **E. Laqueur**-Amsterdam, **O. Lemmermann**-Berlin, **P. A. Levene**-New York, **L. v. Liebermann**-Budapest, **J. Loeb**-New York, **S. Loewe**-Dorpat, **A. Loewy**-Davos, **H. Lüers**-München, **Th. Madsen**-Kopenhagen, **A. Magnus-Levy**-Berlin, **J. A. Mandel**-New York, **L. Marchlewski**-Krakau, **P. Mayer**-Karlsbad, **J. Meisenheimer**-Tübingen, **L. Michaelis**-Nagoya, **H. Molisch**-Wien, **J. Morgenroth**-Berlin, **E. Münzer**-Prag, **H. Murschhauser**-Düsseldorf, **W. Nernst**-Berlin, **C. v. Noorden**-Frankfurt a. M., **W. Ostwald**-Leipzig, **J. K. Parnas**-Lemberg, **Th. Paul**-München, **W. Pauli**-Wien, **R. Pfeiffer**-Breslau, **E. P. Pick**-Wien, **L. Pincussen**-Berlin, **J. Pohl**-Breslau, **Ch. Porcher**-Lyon, **H. Pringsheim**-Berlin, **P. Rona**-Berlin, **H. Sachs**-Heidelberg, **S. Salaskin**-St. Petersburg, **T. Sasaki**-Tokio, **A. Scheunert**-Berlin, **A. Schlossmann**-Düsseldorf, **E. Schmitz**-Breslau, **S. P. L. Sörensen**-Kopenhagen, **K. Spiro**-Basel, **E. H. Starling**-London, **J. Stoklasa**-Prag, **W. Straub**-München, **K. Suto**-Kanazawa, **U. Suzuki**-Tokio, **H. v. Tappeiner**-München, **K. Thomas**-Leipzig, **H. Thoms**-Berlin, **E. Trendelenburg**-Freiburg i. Br., **O. Warburg**-Berlin, **A. v. Wassermann**-Berlin, **E. Widmark**-Lund, **W. Wichowski**-Prag, **A. Wohl**-Danzig, **J. Wohlgemuth**-Berlin

herausgegeben von

C. Neuberg-Berlin

Hundertvierzigster Band



Berlin
Verlag von Julius Springer
1923

Druck von Friedr. Vieweg & Sohn Akt.-Ges., Braunschweig.

Inhaltsverzeichnis.

Über die Wirkung von „Bayer 205“ auf die Blutgerinnung in vivo und in vitro.

Von

O. Steppuhn und S. Brychonenko.

(Aus der Abteilung für experimentelle Pathologie und Pharmakologie des Staatlichen chemo-pharmazeutischen Forschungsinstituts zu Moskau.)

(Eingegangen am 7. Mai 1923.)

Mit Abbildungen 1 bis 8 im Text.

In unserer vorläufigen Mitteilung[1]) haben wir bereits darauf hingewiesen, daß das Trypanosomenmittel „Bayer 205“, in die Blutbahn eines Kaninchens eingeführt, in Abhängigkeit von der Dosis vorübergehende oder anhaltende Verlangsamung oder Aufhebung der Blutgerinnung hervorruft. Durch Zusatz von „Bayer 205“ zu Vollblut ist dieselbe Erscheinung in vitro zu beobachten. Vorliegende Arbeit hatte zum Ziele, dieser interessanten Beobachtung in den Einzelheiten genauer nachzugehen, um erst einmal das Verhältnis der Dosis zur Intensität der Erscheinung zu ermitteln und nach Möglichkeit zu erforschen, welche Faktoren des Gerinnungsprozesses vom Mittel betroffen werden und zur Ungerinnbarkeit des Blutes führen. Gleich in den ersten Untersuchungen war eine gewisse Beeinflussung des Blutes durch das Medikament aufgefallen. Auch sprachen in ihrer ersten Arbeit *Mayer* und *Zeiss*[2]) von einer toxischen Wirkung in erster Linie auf das Blut und seine Elemente, die sich in starker regenerativer Veränderung neben Anämie zeigt, sowie über Herabsetzung der Blutgerinnung, die *Weichbrodt*[3]) am Menschen bestätigen kann; vgl. ferner *Mayer*[4]).

---

[1]) *O. Steppuhn, H. Zeiss* und *S. Brychonenko*, Arch. f. Schiffs- u. Tropenhyg. **27**, 1923.

[2]) Ebendaselbst **24**, 1920.

[3]) Berl. klin. Wochenschr. Nr. 2, 1921.

[4]) Arch. f. Schiffs- u. Tropenhyg. **26**, 1922; Deutsch. med. Wochenschr. Nr. 40, 1922.

In Verbindung mit einer ganz anderen uns interessierenden Fragestellung haben wir auch die Einwirkung von „Bayer 205" auf die Wärmeregulation studiert, wir hatten desto mehr Ursache, die Möglichkeit einer solchen Einwirkung anzunehmen, als einige Vergiftungssymptome mit „Bayer 205" auf die Erregung des Nervus vagus hinwiesen[1]).

In vivo-Versuche.

Zwecks Klarlegung der Verhältnisse zwischen Dosis und Gerinnungsverlangsamung wurde das Mittel, frisch in destilliertem Wasser gelöst und nicht sterilisiert, Kaninchen in die Ohrvene eingeführt, beginnend mit den kleinsten, pharmakologisch kaum in Betracht zu ziehenden bis zu den höchsten, den Tod rasch herbeiführenden Gaben. Die Gerinnung wurde in kleinen, flachen Porzellanschälchen beobachtet (normale Gerinnungszeit 2 bis 4 Min.). Diese sonst grobe Methode genügte für den vorliegenden Zweck vollkommen, da es sich um Differenzen in der Gerinnungszeit v. mindestens mehreren Minuten handelte. Die Temperatur des Tieres wurde ununterbrochen registriert.

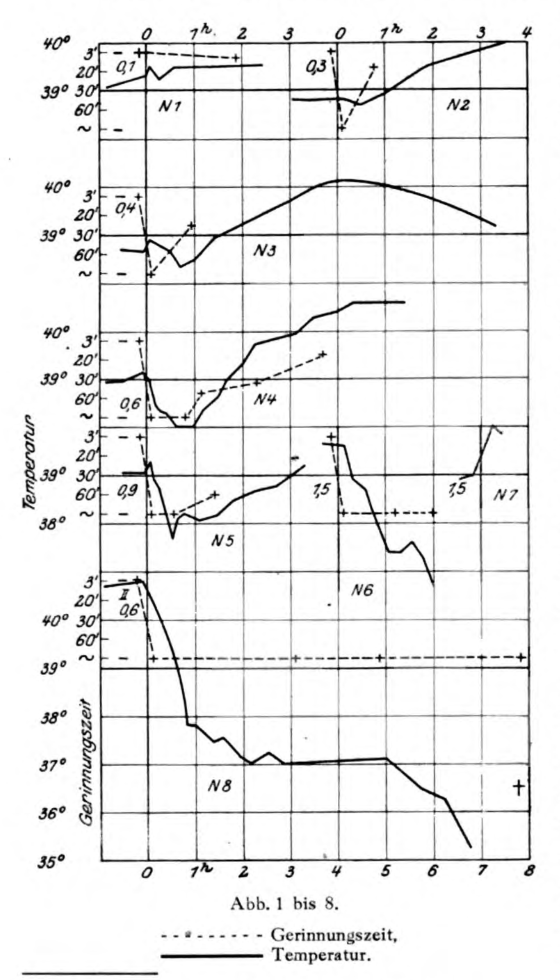


Abb. 1 bis 8.

- - + - - - - - - Gerinnungszeit,
——— Temperatur.

Schon 0,1 g „Bayer 205" (Abb. 1 u. Kolonne I der Tabelle I) ruft einige Verlangsamung der Blutgerinnung hervor; die Temperatur steigt etwas im Verlaufe von 2 bis 3 Stunden (0,5° C) und fällt dann wieder allmählich zur Norm.

1) Siehe Anmerkung 1) auf Seite 4.

0,3 g „Bayer 205“ (Abb. 2 und Kolonne 2 der Tabelle I) gibt bereits sofort nach der Injektion eine vollkommene *Ungerinnbarkeit*, jedoch nach 30 bis 45 Minuten erlangt das Blut die Gerinnungsfähigkeit wieder mit einer Verzögerung von 2 bis 4 Minuten auf 10 bis 15 Minuten. Die Temperatur des Tieres *fällt* während 35 Minuten um 0,2 bis 0,3° C, steigt dann im Verlaufe von 4 Stunden, um schließlich etwa 1° C über der Norm zu erreichen. In dieser Phase nähert sich auch die Gerinnungsfähigkeit immer mehr der normalen.

Gaben von 0,4 bis 0,6 g „Bayer 205“ (Abb. 3 und 4 und Kolonne 3 und 4 der Tabelle I) rufen in den ersten 45 bis 60 Minuten *Ungerinnbarkeit* und *Temperatursturz* um 0,8 bis 1,0° C hervor. Ganz allmählich wird dann das Blut wieder gerinnbar (in 10 bis 20 Minuten lockeres Gerinnsel 5 Stunden nach Injektion). Parallel steigt auch die Temperatur während 5 Stunden, indem sie zuletzt die Norm um 1,5 bis 1,8° C übersteigt. In den darauf folgenden Tagen hält eine um 0,8 bis 1,0° C erhöhte Temperatur an.

Diese Gaben ziehen bei den Tieren keinerlei merkliche Reaktionen nach sich: sie sind munter und gehen niemals ein.

Höhere Gaben, 0,8 bis 0,9 g (Abb. 5 und Kolonne 5 der Tabelle I) haben eine längere Ungerinnbarkeit des Blutes zur Folge: (etwa 1 Stunde 30 Minuten) erst nach 1 Stunde 45 Minuten beginnen Spuren einer Gerinnung sich bemerkbar zu machen. Die Temperatur stürzt im Verlaufe von 20 bis 30 Minuten um 1,5° C, beginnt aber schon nach 60 Minuten mit ihrem Anstieg, um die Norm nicht nur zu erreichen, sondern auch zu übersteigen. Oft gehen die Tiere in der darauf folgenden Nacht ein und doch, trotz der so ausgeprägten Blutveränderung und Störung des Temperaturgleichgewichts, sind in den ersten Stunden nach der Injektion weder Vergiftungserscheinungen noch Krämpfe oder Kollaps zu beobachten.

Gaben von 1,5 g „Bayer 205“ sind ausgesprochen toxisch.

Sofort nach Injektion tritt eine deutliche Pupillenverengung ein. Die Temperatur fällt, wenn keine Krämpfe eintreten, um 3,0° C und mehr. Das Tier ist einem Kollaps nahe, *das Blut gerinnt nicht*. Von Zeit zu Zeit treten eigenartige, mit Nackenkontraktion verbundene Krämpfe in Erscheinung — in diesen Fällen stirbt das Tier erst in der darauf folgenden Nacht.

In Fällen, wo der Tod schon etwa 25 Minuten nach Injektion eintritt, beobachtet man andersartige heftige tonische Krämpfe, Streckung der Beine und des Körpers, Apnoe, Speichelschaum und Kollaps.

Als Allgemeinergebnis dieser Beobachtungen wäre zu erwähnen, daß „Bayer 205“ *vor allen Dingen Blutgerinnung und Wärmeregulation beeinflußt* — dieses sind die am frühesten auftretenden sichtbaren Erscheinungen.

Als kleinste, die sofortige und vollkommene, wenn auch vorübergehende Ungerinnbarkeit des Blutes hervorrufenden Gaben wären 0,3 bis 0,4 g „Bayer 205" zu bezeichnen, was, auf die Gesamtmenge des Blutes umgerechnet, einen Gehalt von 0,2% ergibt. Wie wir weiter sehen werden, ist gerade diese Konzentration von „Bayer 205" nötig, um Blut in vitro gerinnungsunfähig zu machen. *Dieses*, wie auch die Tatsache, daß die *Ungerinnbarkeit in vivo sofort* nach der Injektion eintritt, legt den Gedanken nahe, daß das *Prinzip der Wirkung* in beiden Fällen — in vivo wie in vitro — *dasselbe und unmittelbar auf das Blut selbst gerichtet sein muß.*

Der Eintritt der Ungerinnbarkeit fällt stets mit der Periode des Temperatursturzes zusammen, wobei beide Prozesse, was Intensität und Dauer anbetrifft, gleich sind. In der Periode des Temperaturanstiegs macht sich auch eine Tendenz zur Wiedererlangung der Gerinnung bemerkbar, jedoch wird die normale Gerinnungszeit erst nach längerer Zeit erreicht, die Temperatur steigt dabei bis zu einem Fieberniveau, wobei die Temperaturkurve die charakteristische Form eines Bogens erlangt. Es scheint, daß diese beiden Prozesse — Gerinnungsverlangsamung und Temperaturveränderung — eng miteinander verbunden sind, im Gegensatz dazu haben die toxischen, krampfartigen Erscheinungen nichts damit zu tun und sind wohl als Resultate einer unmittelbaren Wirkung des Mittels auf das zentrale Nervensystem zu betrachten[1]).

Wie bereits *Mayer* und *Zeiss*[2]) feststellen konnten, behält das Serum der mit „Bayer 205" vorbehandelten Tiere noch monatelang kurative Eigenschaften, was wir auf eine kolloidale Adsorption des Mittels durch die Eiweißstoffe des Blutes[3]) oder vielleicht auch der Zellelemente zurückgeführt haben. In vollem Einklang damit haben wir gefunden, daß bei *wiederholter* Einführung des Mittels die *Reaktion*, was Blut und Temperatur anlangt, *viel intensiver ist*, wie wenn das Mittel in derselben Dosis nur einmal eingeführt wird. Es macht den Eindruck, als ob die Wirkung bei Reinjektion durch die Summe der Gaben beider Injektionen bedingt sei.

---

[1]) Hält man sich an die von *H. H. Meyer* und *R. Gottlieb* durchgeführte Einteilung der zentral wirkenden Krampfgifte in die Gruppe der Gifte, für die *sympathikotonische* Erscheinungen charakteristisch sind und deren Wirkung mit einem Temperaturanstieg einhergehen, und die Gruppe, für die *vagotonische* Erscheinungen charakteristisch sind und die von einem Temperatursturz begleitet werden, so wäre Bayer 205 in die letzte Gruppe einzureihen (Santonin, Pikrotoxin und andere), da es außer des anfänglichen Temperaturabfalles z. B. auch ausgesprochene Mydriasis, Pulsverlangsamung usw. hervorruft. Darüber soll ausführlich an anderer Stelle berichtet werden.

[2]) *M. Mayer* und *H. Zeiss*, Arch. f. Schiffs- u. Tropenhyg. **25**, 1921.

[3]) *O. Steppuhn, H. Zeiss* und *S. Brychonenko*, ebendaselbst **27**, 1923.

Ein Kaninchen erhielt 0,6 g des Präparates (Abb. 4), wonach im Verlauf der ersten Stunde Temperaturabfall um 1° C und vollkommene Ungerinnbarkeit des Blutes eintraten, danach stieg die Temperatur während 4 Stunden um 2,5° C, die Gerinnung blieb gehemmt. Nach 48 Stunden wurde die Injektion wiederholt (Abb. 8), die Temperatur stürzte in 40 Minuten um 3,0° C und dann weiter allmählich um noch 1,0°. Die subnormale Temperatur hielt 5 Stunden an, wonach ein weiterer Sturz bis zu 33° C und Tod im Kollaps eintraten. Das Blut blieb bis zum Tode ungerinnbar[1]). Da vor der Reinjektion das Blut normale Gerinnbarkeit hatte und die Temperatur über der Norm lag, so muß wohl das Mittel in dieser Periode nicht auf den Elementen des Blutes, die für den Gerinnungsprozeß nötig sind, fixiert gewesen sein und war vielleicht von den Geweben der Gefäßwände und dergleichen adsorbiert.

Es muß auch hervorgehoben werden, daß das Mittel nach vorsichtiger Sterilisation mindestens um ein Drittel schwächer wirkte, was die Einwirkung auf Blut und Temperatur betrifft.

Tabelle I.

Einwirkung von „Bayer 205“ auf Kaninchen bei einmaliger intravenöser Injektion.

Die Nummern entsprechen denen der Kurven. ∞ bedeutet „ungerinnbar“. † bedeutet „Tod“.

Zeit nach Injektion	Nr.: 1		2		3		4		5		6		7
	Dosis: 0,1		0,3		0,4		0,6		0,9		1,5		1,5 g
	t^0	ger.	t^0	ger.	t^0	ger.	t^0	ger.	t^0	ger.	t_0	ger.	t^0
0	39,3	3′	38,8	3′	38,7	3′	39,0	3′	39,1	3′	39,6	3′	39,0
30′	39,4		38,7	∞	38,7	∞	38,2	∞	37,9	∞	38,8	∞	40,0
1h	39,5		38,9	15′	38,5	25′	38,0	∞	38,1	∞	37,6	∞	†
	39,5		39,2		38,9		38,6	45′	38,2	60′	37,5	∞	
2	39,5	4′	39,5		39,2		39,3		38,6		36,7	∞	
	39,5		39,7		39,4		39,8	30′	38,7				
3			39,8		39,7		39,9		39,0				
			40,0		40,0		40,3	15′	39,3				
4			40,0		40,1		40,4						
			40,0		40,1		40,6						
5					40,0		40,6						
					39,9		40,6						
6					39,7								
					39,5								
7					39,3								
					39,1								
8													

[1]) Das Plasma dieses Tieres machte normales Kaninchenblut ungerinnbar, wenn es demselben im Verhältnis 1 : 15 zugesetzt wurde.

Tabelle II. Einwirkung von „Bayer 205" bei wiederholter Injektion.

Zeit nach Injektion	Nr.: 8		9		10	
	Dosis: 0.6 II		0,3 II		0,56 g	
	t^0	ger.	t^0	ger.	t^0	ger.
0	40,8	3′	39,8		39,2	3′
	39,2	∞	38,5		39.2	∞
1h	37,8		38,2		39,3	2′
	37,5		38,6		39,6	
2	37,1		38,9		39,8	6′
	37,2		39,3			
3	37,0	∞	39,6			
	37,0					
4	37,1					
	37,1	∞				
5	37,1					
	36,7					
6	36,4					
	35,8					
7		∞				
	33,0					
8	†					

Im Versuch 8 war die erste Injektion 48 Stunden vor dieser und ist unter Nr. 4 in Tabelle I angeführt. Im Versuch 9 war die erste Injektion 6 Tage vor dieser und ist unter Nr. 1 in Tabelle I angeführt. Im Versuch 10 einmalige Injektion von „Bayer 205" nach vorheriger Sterilisation der Lösung.

Wie bekannt, liegen Heildosis und toxische Dosis für „Bayer 205" sehr weit entfernt. Nichtsdestoweniger kann bei mehrmaliger Einführung therapeutischer Gaben die Gefahr einer Kumulation eintreten. Die beschriebenen Veränderungen seitens des Blutes und Wärmehaushaltes lassen aber die nahende Gefahr der Kumulation viel eher erkennen, als daß bedrohliche Symptome im Allgemeinzustand des Organismus auftreten. Es würde sich demgemäß empfehlen, bei wiederholter Einverleibung von „Bayer 205" während der ersten Stunde nach der Eingabe die Temperatur und die Blutgerinnung (aproximativ) zu verfolgen.

Die oben dargelegten Versuche über Veränderung der Blutgerinnung unter Einwirkung von „Bayer 205" in vivo gestatten uns festzustellen: 1. die kleinste, vollkommene Ungerinnbarkeit des Blutes verursachende Dosis, 2. die Dauer des Fehlens oder der Verzögerung der Gerinnung. Die Frage nach der Ursache der Ungerinnbarkeit war aber damit nicht geklärt; es mußte nun festgestellt werden, welche an dem Gerinnungsprozeß teilnehmenden Komponenten dabei geschädigt wurden. Um den mit der Erforschung dieser Fragen verknüpften Schwierigkeiten bei in vivo-Versuchen aus dem Wege zu gehen, bedienten wir uns der in letzter Zeit ausgearbeiteten Methode (*Bordet* und *Delange*,

Hirschfeld und *Klinger* und *Herzfeld* und *Klinger*) der Isolierung einzelner Gerinnungskomponenten.

In vitro-Versuche.

Ob nun die Gerinnung ein rein fermentativer oder kolloid-chemischer Prozeß sei, bleibe hier unberücksichtigt. Darüber ist man sich aber einig, daß er in zwei Phasen verläuft: 1. Bildung des Thrombins aus Prothrombin mittels Thrombokinase in Gegenwart von Calciumionen, 2. die eigentliche Gerinnung als Resultat der Einwirkung von Thrombin auf Fibrinogen, wobei Fibrin gebildet wird. Die erste Phase kann nur in Gegenwart von Calcium zustande kommen, die zweite verläuft auch ohne Calcium, z. B. in Oxalatmedium. Im Plasma sind Prothrombin und Fibrinogen enthalten, die Formelemente des Blutes sind Träger der Thrombokinase.

Es mußte vor allen Dingen festgestellt werden, was für eine Konzentration an „Bayer 205“ die Blutgerinnung in vitro vollkommen verhindert. *Für das Kaninchenblut* (Blut anderer Tiere gab davon abweichende Zahlen) wurde in einigen Versuchsreihen wiederholt etwa 0,2proz. als notwendig und genügend befunden, um das Blut ungerinnbar zu machen. Es sei ein diesbezüglicher Versuch angeführt (Tabelle III):

Tabelle III.

0	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1,0	„Bayer 205“ 10proz.
1,0	0,6	0,5	0,4	0,3	0,2	0,1	1	Destilliertes Wasser
Zu 0,1 ccm jeder Verdünnung zugesetzt je 4,0 Kaninchenblut.								
3′ kompl.	8′ kompl.	12′ Beginn 22′ kompl.	25′ kaum	kaum	keine Gerinnung			Gerinnungszeit

Das durch „Bayer 205“ ungerinnbar gemachte Blut kann weder durch Ca, noch durch Serum oder Thrombokinase (Organextrakt) zur Gerinnung gebracht werden — dieses weist darauf hin, daß die Wirkung des Medikamentes, von anderem abgesehen, *unmittelbar auf das Fibrinogen gerichtet ist.* Um dieser Frage genauer nachzugehen, wurde Hundeoxalatplasma durch Vermischen von Hundeblut mit Natriumoxalat und Abscheidung der Formelemente nach zweistündigem Zentrifugieren, erhalten. Dieses Plasma enthält Prothrombin, Fibrinogen und Spuren von Thrombokinase, es gerinnt nur nach Calciumzusatz im Überschuß, und zwar in unserem Falle nach 7 Minuten. Dieser Versuch diente uns als Kontrolle.

Es wurde vor allen Dingen diejenige Konzentration „Bayer 205“ bestimmt, welche die Gerinnung dieses Plasmas trotz Rekalzifizierung verhinderte (Reagenzglasversuche bei 11 bis 13° C). Wachsende Mengen

„Bayer 205“ gaben wir gleichen Quantitäten Oxalatplasma hinzu, wonach das Gemisch rekalzifiziert wurde.

Es stellte sich heraus, daß bei einem Gehalt von 0,2% an „Bayer 205“ das Plasma endgültig ungerinnbar wird. Bei geringeren Konzentrationen ist die Gerinnung gehemmt. Somit erhalten wir hier wieder dieselbe Zahl wie bei den in vivo- und in vitro-Versuchen mit Vollblut, was ja auch natürlich ist. Die Verhältnisse werden durch die Tabellen IV und V illustriert.

Tabelle IV.

+	+	+	+	+	+	1,0 Hundeoxalatlpasma
0,5	0,4	0,3	0,2	0,1	0	„Bayer 205“, 5proz.
+	+	+	+	+	+	0,15 1proz. $CaCl_2$-Lösung
		fehlt			7' +	Gerinnung nach 30'
+	+	+	+	+		Weitere 0,15 1proz. $CaCl_2$-Lösung
		fehlt				Gerinnung

Tabelle V.

+	+	+	+	+	1,0 Hundeoxalatplasma
0,15	0,1	0,05	0,03	0	„Bayer 205“, 2proz.
0,03	0,08	0,13	0,15	0,18	Destilliertes Wasser
+	+	+	+	+	0,15 1proz. $CaCl_2$-Lösung
fehlt		24—27'	21'	7'	Gerinnung

Alle Versuche führten wir in Reagenzgläsern aus, wobei die zu untersuchenden Flüssigkeiten nacheinander zugegeben wurden. Die Benennung der entsprechenden Flüssigkeiten ist in der rechten Hälfte der Tabelle angegeben. Die +-Zeichen links bedeuten, daß die in der rechten Hälfte angegebene Flüssigkeit in der angegebenen Menge zugesetzt wurde. Die Zahlen bedeuten Kubikzentimeter oder Gerinnungszeit in Minuten bei Zimmertemperatur von 11 bis 13° C.

Weder Zusatz von einem Kalküberschuß oder Thrombin in Form frischen Kaninchenserums, oder Thrombokinase als Organextrakt führt zur Wiedererlangung der Gerinnbarkeit des Plasmas. Es wird augenscheinlich bei gegebener Konzentration das *Fibrinogen* des Plasmas irgendwie verändert oder gebunden.

Um die Einwirkung von „Bayer 205“ auf das Thrombin zu studieren, benutzten wir durch Zusatz von Natriumoxalat von Calcium befreites, frisches Kaninchenserum. Wird die Reaktion in Abwesenheit von Kalk vorgenommen, so kann ein solches „Oxalatserum“ als reine Thrombinlösung betrachtet werden, indem man nur mit dem im Serum *bereits vorhandenen* Thrombin rechnet; das Oxalatplasma, als reine Fibrinogenlösung, da das in diesen Flüssigkeiten noch vorhandene Prothrombin ohne Kalk kein weiteres Thrombin liefern kann. Erst bei der Rekalzifizierung muß mit Nachschub von Thrombin gerechnet werden. Das von uns gebrauchte Kaninchenserum (mit Natrium-

oxalat) brachte Oxalatplasma im Verhältnis 1 : 15 zur Gerinnung. Um die Einwirkung von „Bayer 205“ auf dieses Serum, d. h. Thrombin, zu klären, setzten wir zu gleichen überschüssigen Serummengen aufsteigende Mengen „Bayer 205“-Lösung hinzu; nach 15 Minuten wurde überall gleiche Quantität Oxalatplasma zugegeben. Wie man aus den folgenden Tabellen VI und VII ersieht, hörte die Gerinnung auf, wo die Konzentration von „Bayer 205“ im *Verhältnis zum Serum 0,2 proz. war, im Verhältnis zum Plasma war die Lösung 0,1 proz., zur Gesamtflüssigkeit 0,07 proz.*

Tabelle VI.

+	+	+	+	+	+	0,5 frisches Kaninchenserum
0,2	0,15	0,1	0,05	0,03	0	„Bayer 205“, 1 proz.
+	+	+	+	+	+	0,1 1 proz. Natriumoxalat
+	+	+	+	+	+	1,0 Oxalatplasma
	fehlt		8′	7′	7′	Gerinnung
kompakt. Gerinnsel						Nach 30′ 0,5 1 proz. $CaCl_2$

Tabelle VII.

+	+	+	+	1,0 50 proz. Kaninchenserum mit Natriumoxalat
0,35	0,2	0,1	0	„Bayer 205“, 1 proz.
+	+	+	+	0,5 Hundeoxalatplasma
fehlt	fehlt	nach 12^h	10′	Gerinnung

Da das Oxalatplasma bei einer solchen „Bayer 205“-Konzentration gerinnt, so kann die Verhinderung der Gerinnung in diesem Falle nur auf Zerstörung oder Bindung *des Serum-Thrombins* beruhen. Setzt man demgemäß zu den nicht gerinnenden Portionen Kalk hinzu, wodurch Nachschub von Thrombin bewirkt wird, so tritt die Gerinnung ein. Selbstverständlich wurde in besonderen Versuchen festgestellt, daß „Bayer 205“ nicht den Kalk (wie Oxal- oder Citronensäure) verändert: ungerinnbar gemachtes Blut konnte niemals durch Kalkzusatz zur Gerinnung gebracht werden.

Um in den eben dargelegten Versuchen noch mehr die mögliche Einwirkung von „Bayer 205“ auch auf das Plasma auszuschließen, benutzten wir in anderen Versuchen die minimalsten möglichen Serummengen (Thrombinlösung). Es stellte sich heraus, daß Serum, welches unser Plasma im Verhältnis 1 : 20 in 7 Minuten zur Gerinnung brachte, diese Eigenschaft verlor, wenn ihm anfänglich „Bayer 205“ im Verhältnis 2 : 1000 (0,2 proz.) zugesetzt wurde. Da in diesem Falle die „Bayer 205“-Konzentration, auf das Plasma berechnet, nur 0,01 proz. ausmachte, so kann hier die Wirkung, da ja nur ein sehr kleiner Teil des Fibrinogens geschädigt sein muß, nur auf einer *Thrombinschädigung* beruhen (Tabelle VIII).

Tabelle VIII.

+	+	+	+	1,0 Oxalatplasma
0	0,05	0,07	0,1	Kaninchenserum mit „Bayer 205", 0,2 proz.
0,05	0	0	0	Kaninchenserum, Kontrolle
7'	fehlt	14'	5'	Gerinnung

Eine folgende Beobachtung gibt die Möglichkeit, zu entscheiden, ob „Bayer 205" auf die Thrombokinase wirkt. Setzen wir durch „Bayer 205" ungerinnbar gemachtes Blut zu Oxalatplasma und rekalzifizieren die Mischung, so wird, wenn entsprechende Mengenverhältnisse gewahrt sind, nicht nur eine Ungerinnbarkeit des Plasmas notiert, sondern es tritt eine *Beschleunigung* der Gerinnung (2- bis 2,5 mal) ein (Tabelle IX). Das Blut fungiert in diesem Falle als Thrombokinase, trotz „Bayer 205"-Gehalt des Blutes. *Es wird somit die Thrombokinase durch „Bayer 205" nicht geschädigt.*

Tabelle IX.

+	+	+	1,0 Hundeoxalatplasma
+	+	0	0,5 frisches Blut, ungerinnbar durch 0,3 proz. „Bayer 205"
0	+	+	0,3 1 proz. $CaCl_2$-Lösung
fehlt	3'	8'	Gerinnung

Wenn wir bis jetzt ganz allgemein von einer Vernichtung, Schädigung oder Bindung von Fibrinogen und Thrombin gesprochen haben, so liegt es daran, daß es uns zu weit führen würde, im Rahmen dieser Arbeit die Einwirkung auf genannte Gerinnungskomponenten durch einen genaueren Begriff, auf Beweismaterial gestützt, zu charakterisieren. In unserer vorläufigen Mitteilung haben wir aber schon angegeben, daß die Einwirkung von „Bayer 205" auf Fibrinogen und Thrombin eine Teilerscheinung der allgemeinen Eigenschaft des Mittels ist, Eiweiß in Lösungen zu adsorbieren, wodurch dieses seiner physikalisch-chemischen Eigenschaften beraubt wird. Wir konnten nämlich zeigen, daß Serum mit „Bayer 205"-Zusatz in der Flamme nicht koaguliert, durch Sublimat und Tannin nicht ausgefüllt wird und anderes mehr.

Die ausgesprochene gerinnungshemmende Eigenschaft von „Bayer 205", welches in dieser Hinsicht mit Hirudin konkurieren könnte, machen das Mittel zu einem wertvollen Objekt in der hämatologischen Praxis: es mag sein, daß es bei der Bestimmung verschiedener physikalischer Blutkonstanten, der Isolierung der Formelemente, der Scheidung von Leucocyten und Blutplättchen, bei Bestimmung verschiedener Stoffe im Gesamtblut und dergleichen gute Dienste

zu leisten imstande sein wird. Dessen Anwendung bei *Bluttransfusionen*, oder vielleicht zwecks therapeutischer Gerinnungshemmung bei Thrombosis ist nicht ausgeschlossen. Auch könnte es bei physiologischen Arbeiten — so z. B. zur Gerinnungsverhinderung bei Blutdruckregistrierung am Kymographion — Verwendung finden, dieses um so mehr, als die gerinnungsverhindernden Gaben, intravenös eingeführt, nicht merklich die Blutdruckkurve beeinflussen.

Zusammenfassung.

1. Durch intravenöse Injektion von „Bayer 205" bei erwachsenen Kaninchen in Gaben von 0,2 bis 0,3 g pro Kilogramm tritt eine zeitliche, aber vollkommene Ungerinnbarkeit des Blutes ein. Kleinere Gaben rufen nur Gerinnungsverlangsamung hervor.

2. Dieser Effekt beruht in vivo auf einer *unmittelbaren* Einwirkung des Mittels auf *das Blut selbst*; die quantitativen Verhältnisse entsprechen genau denen in vitro.

3. Frisches Blut wird bei 0,2 proz. „Bayer 205"-Gehalt vollkommen ungerinnbar; geringere Konzentrationen führen zu einer *teilweisen oder unvollkommenen* Gerinnung (lockere Gerinnsel).

4. Die gerinnungsverhindernde Wirkung von „Bayer 205" beruht auf der Bindung der für den Gerinnungsprozeß nötigen Eiweißkomponenten Thrombin und Fibrinogen; es läßt sich die isolierte Bindung einzeln an diesen Komponenten demonstrieren. Die Thrombokinase wird von dem Mittel nicht berührt. Es wäre dadurch möglich, die Thrombokinasewirkung im Blute quantitativ ohne Mitwirkung von Thrombin und Fibrinogen zu verfolgen.

Der Einfluß verschiedener Präparate der Chiningruppe auf die fermentativen Funktionen des Organismus.

II. Mitteilung[1]).

Der Einfluß einiger Chinin- und Harnstoffverbindungen auf die Speichelamylase[2]).

Von

I. A. Smorodinzew und A. S. Nowikow.

(Aus der chemo-therapeutischen Abteilung des Tropeninstituts Moskau.)

(Eingegangen am 7. Mai 1923.)

Obgleich das Chinin eines der ältesten und gebräuchlichsten Arzneipräparate ist, ist dessen Einfluß auf die fermentativen Funktionen des Organismus und im besonderen auf die Speichelamylase noch bei weitem nicht genügend erforscht. Nach den Beobachtungen einiger Forscher beschleunigt eine 0,1 proz. Chininacetatlösung[3]) ein wenig die Wirkung des Ptyalins, des Amylopsins und der Blutamylase[4]), aber eine ebensolche Chininsulfatlösung verlangsamt die Arbeit der Harnamylase[5]), und eine 0,4 proz. Chininsulfat- und eine 0,02 proz. Chininchloridlösung[6]) verzögern die Spaltung des Glykogens bei Gegenwart von Leberamylase sowohl im überlebenden Organ[4])[6]) als in einem mittels 0,2 proz. Fluornatriumlösung bereiteten Leberextrakt[7]). *Goebel* gelang es nicht, einen Einfluß einer n/100 Chininchloridlösung auf Takadiastase wahrzunehmen, konstatierte aber Verzögerung der Saccharifizierung von Stärke durch dieselbe bei Gegenwart einer ebensolchen Lösung von freiem Chinin[8]).

Alle genannten Autoren nahmen Amylase verschiedenen Ursprungs und bedienten sich verschiedener Methoden, weshalb sie auch miteinander unvergleichbare Resultate erhielten. Wir benutzten das

---

[1]) I. Mitteilung von *I. A. Smorodinzew* und *A. N. Adowa*, diese Zeitschr. **135**, 128, 1923.

[2]) Mitgeteilt in einer Sitzung der wissenschaftlichen Konferenz des Tropeninstituts am 6. Februar 1923.

[3]) *O. Nasse*, Pflügers Arch. **11**, 160, 1875.

[4]) *E. Cavazzani*, Arch. Phys. suppl. 1899, S. 105.

[5]) *E. Dubourg*, Ann. Past. **3**, 302, 1899; *E. Duclaux*, Microbiol. **2**, § 314, 1900.

[6]) *K. S. Iwanow*, Bildung von Zucker in der isolierten Leber (russisch) 1905; C. Phys. **19**, 891, 1906.

[7]) *F. Pick*, H. B. **3**, 174, 1902.

[8]) *R. E. Goebel*, Über den Einfluß einiger Alkaloide und ihrer Salze auf die Wirkung des diastatischen Ferments (russisch) 1905.

von *Roberts*[1]) und *Detmer*[2]) vorgeschlagene und von *Wohlgemuth*[3]) und *Johnson*[4]) ausgearbeitete als das für uns vorteilhafteste Verfahren[5]), um zu bestimmen, ob Chinin auf Speichelamylase einen Einfluß ausübt und in was für Konzentrationen es seine Wirkung offenbart.

Obgleich das Chinin Jod bindet und von diesem gefällt wird, so konnten wir doch bei der Aufstellung paralleler Versuche mit und ohne Chinin und Benutzung des „achromatischen Punktes" die Überzeugung gewinnen, daß die Chininpräparate zum Unterschied von ihrem Einfluß auf Tryptase[6]) die Verdauung der Stärke durch das Ptyalin fördern, während die Harnstoffverbindungen, die die Arbeit der Tryptase stimulieren, im gegebenen Falle einen verzögernden Effekt hervorbrachten (s. Tabelle I bis V).

Möglicherweise hängt hier der Unterschied vom komplexen Charakter der Amylase ab; alle erwähnten Autoren bestimmten die reduzierenden Eigenschaften in den Verdauungsprodukten der Stärke, während wir die Erytrodextrinreaktion zur Richtschnur nahmen. Auf Grund dieser Betrachtung darf man mit Recht zulassen, daß das Chinin nur die erste Phase des Zerfalls der Stärke, d. h. die Arbeit der Amylase im eigentlichen Sinne des Wortes, beschleunigt, während es auf die Dextrinase, die die Verzuckerung der Dextrine bedingt, im Gegenteil verzögernd wirkt. Diese Annahme bedarf experimenteller Begründungen, und sind Versuche solcher Art von uns schon eingeleitet und in Angriff genommen.

Schlüsse.

1. Der Amylasegehalt im Speichel ist nicht immer der gleiche.

2. Chininchlorid und Chininsulfat wirken beschleunigend auf die Aktivität der Amylase ein.

3. Der beschleunigende Einfluß auf den Prozeß ist dem Chinin selbst zuzuschreiben.

4. Die beschleunigende Wirkung des Chinins auf die Amylase wird durch den verzögernden Einfluß der Schwefelsäure[6]) und des Harnstoffs in den entsprechenden Präparaten eingeschränkt.

5. Das Chininchlorid legt seine beschleunigende Wirkung bei 0,009 bis 0,014% Gehalt desselben im Medium an den Tag; das Sulfat bei 0,03%.

---

[1]) *W. Roberts*, Proc. roy. soc. Ser. B. **32**, 145, 1881.
[2]) *W. Detmer*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **7**, 1, 1882.
[3]) *J. Wohlgemuth*, diese Zeitschr. **9**, 1, 1908.
[4]) *W. A. Johnson*, Journ. amer. chem. soc. **30**, 798, 1908.
[5]) *I. A. Smorodinzew*, Die Fermente des Pflanzen- und Tierreiches, T. II, S. 156, 1920 (russisch).
[6]) *Derselbe*, ebendaselbst, 2. Aufl., T. I, S. 140, 1922.

6. Die Doppelverbindung von Chinin mit Harnstoff wirkt verzögernd auf die Arbeit der Speichelamylase bei 0,007 bis 0,008 % derselben im Medium.

7. Harnstoff und dessen Salze verzögern die Wirkung der Amylase.

Tabelle I.

Einfluß des Chinins auf Amylase[1]).

Nr.	Reagens: Benennung	Reagens: Konzentration	Konzentration des Ferments	Nr. der letzten farblosen Probierröhrchen	Zahl der Fermenteinheiten
1	Wasser		Speichel (1 : 25)	3	8
2	Chininhydrochlorid[2]) . . .	n/20	"	7	128
3	Wasser		"	4	16
4	Chininhydrochlorid . . .	n/20	"	8	256
5	Wasser		"	4	16
6	Chininhydrochlorid . . .	n/320	"	6	64
7	Wasser		"	4	16
8	Chininsulfat	n/310	"	7	128
9	Wasser		"	4	16
10	Chininsulfat	n/310	"	6	64
11	Wasser		"	4	16
12	Salsz. Carbamidchinin . .	n/20	"	alle blau	—
13	Wasser		"	5	32
14	Salzs. Carbamidchinin . .	n/200	"	1	2
15	Wasser		"	3	8
16	Salzs. Carbamidchinin . .	n/400	"	1	2

Tabelle II.

Einfluß des Chininchlorids und Chininsulfats auf Amylase.

Nr.	Reagens: Benennung	Reagens: Konzentration	Konzentration des Ferments	Nr. d. letzten farblosen Probierröhrchen	Minimale beschleunigende Konzentration: Molekulare	Minimale beschleunigende Konzentration: %	% des Chinins
17	Wasser		Speichel (1:800)	blau			
18	Chininhydrochlorid	n/20	"	6	1/640	0,014	0,013
19	Wasser		"	blau			
20	Chininhydrochlorid	n/800	"	1	1/800	0,011	0,010
21	Wasser		"	blau			
22	Chininhydrochlorid	n/1000	"	1	1/1000	0,009	0,008
23	Wasser		"	blau			
24	Chininhydrochlorid	n/1000	"	1	1/1000	0,009	0,008
25	Wasser		"	blau			
26	Chininsulfat . . .	n/310	"	1	1/310	0,030	0,026
27	Wasser		"	blau			
28	Chininsulfat . . .	n/310	"	1	1/310	0,030	0,026

[1]) In dieser und den folgenden Tabellen sind die typischen Fälle aus einer großen Anzahl von uns ausgeführter analoger Versuche angeführt.

[2]) Die Lösungen der von uns in vorliegender Arbeit benutzten Chinin- und Harnstoffverbindungen wurden liebenswürdigerweise von Frau Dr. *A. N. Adowa* bereitet, wofür wir ihr hier unseren Dank aussprechen.

8. In Salzsäuren, Salpetersäuren, schwefelsauren Salzen des Harnstoffs hängt der verzögernde Einfluß auf die Amylase vom Anion ab.

9. Der nicht ionisierende freie Harnstoff übt auf den Prozeß eine weit schwächere Wirkung aus.

10. Freier Harnstoff offenbart seine verzögernde Wirkung bei einer Konzentration von 0,02 % und dessen Salze schon bei 0,0009 bis 0,0011 %.

11. Gleiche Chinin- und Harnstoffpräparate wirken direkt entgegengesetzt auf die Speichelamylase und Pankreastryptase.

Tabelle III.

Einfluß einer Doppelverbindung von Chinin mit Harnstoff auf Amylase.

Nr.	Reagens		Konzentration des Ferments	Nr. der ersten farblosen Probierröhrchen	Minimale verzögernde Konzentration		% des Chinins
	Benennung	Konzentration			Molekulare	%	
29	Wasser		Speichel (1:200)	alle			
30	Salzs. Carbamidchinin	n/20	„	8	$^{1}/_{1280}$	0,008	0,006
31	Wasser		„	alle			
32	Salzs. Carbamidchinin	n/200	„	5	$^{1}/_{1600}$	0,007	0,005
33	Wasser		„	alle			
34	Salzs. Carbamidchinin	n/400	„	4	$^{1}/_{1600}$	0,007	0,005
35	Wasser		„	alle			
36	Salzs. Carbamidchinin	n/800	„	3	$^{1}/_{1600}$	0,007	0,005

Tabelle IV.

Einfluß des Harnstoffs und dessen Salze auf Amylase.

Nr.	Reagens		Konzentration des Ferments	Nr. der letzten farblosen Probierröhrchen	Zahl der Fermenteinheiten
	Benennung	Konzentration			
37	Wasser		Speichel (1:25)	3	8
38	Harnstoff	n/20	„	1	2
39	Wasser		„	4	16
40	Harnstoff	n/20	„	2	4
41	Wasser		„	3	8
42	Carbamidchlorid	n/20	„	alle blau	—
43	Wasser		„	4	16
44	Carbamidchlorid	n/20	„	alle blau	—
45	Wasser		„	4	16
46	Carbamidnitrat	n/20	„	alle blau	—
47	Wasser		„	4	8
48	Carbamidnitrat	n/20	„	alle blau	—
49	Wasser		„	3	8
50	Carbamidsulfat	n/20	„	alle blau	—
51	Wasser		„	4	16
52	Carbamidsulfat	n/20	„	alle blau	—

Tabelle V.

Einfluß des Harnstoffs und von dessen Salzen auf Amylase.

Nr.	Reagens		Konzentration des Ferments	Nr. der ersten farblosen Probierröhrchen	Minimale verzögernde Konzentration		% des Harnstoffs
	Benennung	Konzentration			Molekulare	%	
53	Wasser		Speichel (1:200)	alle			
54	Harnstoff	n/20	"	4	$^1/_{80}$	0,0187	0,0187
55	Wasser		"	alle			
56	Harnstoff	n/40	"	3	$^1/_{80}$	0,0187	0,0187
57	Wasser		"	alle			
58	Harnstoff	n/20	"	4	$^1/_{80}$	0,0187	0,0187
59	Wasser		"	alle			
60	Carbamidchlorid .	n/20	"	8	$^1/_{1280}$	0,0019	0,0011
61	Wasser		"	alle			
62	Carbamidchlorid .	n/200	"	5	$^1/_{1600}$	0,0015	0,0009
63	Wasser		"	alle			
64	Carbamidchlorid .	n/400	"	4	$^1/_{1600}$	0,0015	0,0009
65	Wasser		"	alle			
66	Carbamidnitrat .	n/20	"	8	$^1/_{1280}$	0,0024	0,0011
67	Wasser		"	alle			
68	Carbamidnitrat .	n/200	"	5	$^1/_{1600}$	0,0019	0,0009
69	Wasser		"	alle			
70	Carbamidnitrat .	n/400	"	4	$^1/_{1600}$	0,0019	0,0009
71	Wasser		"	alle			
72	Carbamidsulfat .	n/20	"	8	$^1/_{1280}$	0,0021	0,0011
73	Wasser		"	alle			
74	Carbamidsulfat .	n/200	"	5	$^1/_{1600}$	0,0017	0,0009
75	Wasser		"	alle			
76	Carbamidsulfat .	n/400	"	4	$^1/_{1600}$	0,0017	0,0009

Über das Wesen der Autolyse.

I. Mitteilung.

Über die Einwirkung von Jod auf Hefeautolyse.

Von

O. Steppuhn und L. Utkin-Ljubowzoff.

(Aus der Abteilung für experimentelle Pathologie und Pharmakologie des staatlichen chemo-pharmazeutischen Forschungsinstituts zu Moskau.)

(Eingegangen am 23. Mai 1923.)

Wenn auch die *Abderhalden*sche Lehre über die Spezifität der Abwehrfermente in ihren letzten theoretischen und praktischen Konsequenzen sich nicht allgemeiner Anerkennung erfreut, so wurzelt sie immerhin in einer kaum zu bezweifelnden einheitlichen biologischen Auffassung der Stoffumsatzprozesse, insbesondere der Eiweißkörper: Aufspaltung des Speiseeiweißes bis zu den letzten Bausteinen, den Aminosäuren, Wiederaufbau jenseits der Darmwand in den Organen nach eigenen Gesetzen und Wiederabbau dort je nach Bedarf. Durch diesen letzten Punkt gerade, der so bedeutungsvoll ist und so vernachlässigt wurde, sind die Organproteasen wieder zu Ehren gekommen. Nun liegt aber leider keinerlei experimentelle Möglichkeit vor, der Veränderung der Organproteasen in vivo, so wie wir es für das Serum können, beizukommen. Die postmortale Autolyse ist das einzige Phänomen, welches uns eine Spaltung des Organeiweißes durch Organferment offenbart, und da kommen wir immer wieder an den zweifelvollen Punkt, ob eben die Autolyse eine, wenn auch korrumpierte Wiederspiegelung der im Organ normal verlaufenden Proteolyse in vivo darstellt.

Es setzt sich wohl *M. Jacoby*[1]) über die diesbezüglichen Zweifel hinweg, und doch ist seine Beweisführung, wenn auch vielleicht möglich, so immerhin wenig überzeugend. Wenn auch die schwach alkalische Reaktion der Säfte genügen würde, um eine glimmende Autolyse in Geweben nicht zu verhindern, so ist es doch nicht verständlich, auf welche Weise eine solche aktive Säuerung der Gewebe erreicht werden konnte, um in kürzester Zeit umfassende Gewebseinschmelzung zu besorgen, wie wir das z. B. aus den Beobachtungen

[1]) *M. Jacoby* in Oppenheimers Handbuch der Biochemie 2, 176.

Mieschers[1]) am laichenden Lachs kennen. Es ist eben nicht zu umgehen, daß das Optimum der Autolyse bei einer physiologisch undenkbaren Wasserstoffionenkonzentration liegt. Möglich ist es ja, daß das autolytische Organferment eine der mannigfaltigen Organproteasen darstellt, latent in den Zellen als Proferment ruht oder, in seiner Wirkung gehemmt, anderen Proteasen das Feld räumt. Erst bei Zerstörung der Zellgemeinschaft, bei Entblößung der Zellinhalte werden alle Hemmungen durchbrochen, eine Anhäufung von ersten sauren Spaltungsprodukten tritt ein, dieses zügelt die nur bei alkalischer Reaktion tätigen Tryptasen und legt sie schließlich brach, das autolytische Ferment mit seinem Optimum bei saurer Reaktion behält das Feld und führt zur endgültigen Sprengung der Eiweißkomplexe. So oder anders — bewiesen ist bis jetzt in keiner Weise, ob das uns von der Autolyse her bekannte Ferment einzig und allein dasselbe ist, welches die Rolle der Organprotease in vivo spielt, ob es nur eines der vielen Organproteasen ist mit bescheidener physiologischer Rolle, oder gar ob es niemals in vivo zur Geltung kommt und sich nur in postmortalen Prozessen manifestiert.

Dieser erwähnten Frage näher nachzugehen, ist Zweck der von uns in Angriff genommenen Arbeit, über deren erste Ergebnisse wir in den vorliegenden Mitteilung berichten[2]).

J. Jobling und *W. Petersen*[3]) haben die interessante Tatsache feststellen können, daß ungesättigte Fettsäuren die Verdauung von Casein durch Trypsin hemmen und daß die Hemmung der Jodzahl der entsprechenden Fettsäuren proportional ist. Als Ausgangspunkt dieser Beobachtung diente die Frage nach den Ursachen der schlechten Selbstverdauung tuberkulös verkäster Herde im Organismus. Diese Erscheinung soll darin ihre Erklärung finden, daß die lipoidreichen Tuberkelbazillen ungesättigte Fettsäuren enthalten, deren Seifen als Antiproteasen fungieren. Verkästes Drüsenmaterial wird nur dann einer Trypsinverdauung zugänglich, wenn es durch Äther-Chloroform von Fett befreit wurde. Nur die verseiften ungesättigten Fettsäuren sollen als Antifermente funktionieren können, desto weniger klar ist es, wie eine Äther-Chloroformextraktion die Hemmungskörper beseitigen kann. Immerhin ist die Beobachtung von größtem Interesse; es soll nämlich eine Jodvorbehandlung des verkästen Materials die Trypsinangreifbarkeit bedeutend vermehren, wodurch auch die therapeutische Beeinflußbarkeit der Tuberkulose durch Jod erklärt werden könnte. Daß Jod auch einen anderen Prozeß der Proteolyse, und zwar der Autolyse, positiv beeinflußt, war schon früher bekannt.

L. Kepinow[4]) hat nämlich feststellen können, daß Zusatz von *Lugol*scher Lösung zu Leberbrei die Selbstverdauung dieses Materials bedeutend fördert; injiziert man Tieren Jod intravenös, so gewinnt deren Leber das Vermögen, stärker zu autolysieren wie die Kontrolle.

M. Kaschiwabara[5]), welcher gegen die *Kepinow*schen Versuche so sehr ins Feld zieht, bestätigt sie schließlich im Prinzip, was Jodwirkung anbetrifft,

---

[1]) Die histochemischen und physiologischen Arbeiten von *Fr. Miescher*, Bd. II, Leipzig.

[2]) Diese einführenden Worte betrachten wir als allgemeine Einleitung zu den von uns in Aussicht genommenen Arbeiten über Autolyse.

[3]) Zeitschr. f. Immun. **23**, 71. 1915.

[4]) Diese Zeitschr. **37**, 238, 1911.

[5]) Zeitschr. f. phys. Chem. **82**, 425, 1912.

und daß *Kepinow* in 0,5proz. natronalkalischer Lösung autolysierte, wie *Kaschiwabara* meint, geht aus keiner Stelle der *Kepinow*schen Arbeit hervor. Es wäre ja möglich, anzunehmen, daß auch diese Jodwirkung auf einer Absättigung der ungesättigten Fettsäureverbindungen des Autolysenmaterials beruhen könnte, daß mit anderen Worten *Joblings* Theorie auch auf die postmortale Proteolyse auszudehnen sei. Andererseits konnte *Kepinow* feststellen, daß jodierter Leberbrei nicht stärker, eher weniger von Trypsin angegriffen wird als Leberbrei ohne Jodzusatz, auch steigt der antitryptische Index nach Jodinjektion, was einmal gegen *J. Joblings* Theorie spricht, zweitens aber, durch den angegebenen Jodeffekt Autolyse und tryptische Spaltung scharf unterscheidet. Dagegen haben *Baer* und *Loeb*[1]) zeigen können, daß Serumzusatz die Autolyse hemmt, woraus sie den Schluß ziehen, daß dem Autolyseferment und dem Trypsin ein gemeinsames Antiferment gegenübersteht. So oder anders — wir kommen immer wieder auf die eingangs aufgeworfene Frage, ob das Autolyseferment und die uns vom Serum her bekannten teilweise auch aus den Organen ausgeschwämmten Tryptasen zu identifizieren seien.

In Anbetracht einer gewissen Konsonanz zwischen den Versuchen von *J. Jobling* und denen von *L. Kepinow* schien es uns von Interesse, nachzuforschen, ob der Chemismus der Jodwirkung auf die Autolyse durch die *Jobling*sche Theorie der Jodierung von Antiferment erklärt werden könnte. Es mußte vor allen Dingen die fördernde Einwirkung von Jod auf Autolyse einer Nachprüfung unterzogen werden, da *Kepinows* Vorgehen (*Kaschiwabara* hielt sich an die Methode *Kepinows*) rein methodisch ja mancherlei Mängel aufweist: die angewandten Jodmengen sind enorm, wobei eine richtige Jodierung des Substrates in alkalischer Lösung bei 40° C durchgeführt wurde; die Frage nach der Jodwirkung auf den Prozeß der Autolyse verwandelt sich dadurch in die Frage nach Autolyse jodierten Eiweißsubstrates. Sollte sich die fördernde Wirkung von Jod auf den Autolyseprozeß bestätigen, dann müßte, wenn die *Jobling*sche Theorie in diesem Falle anzuwenden wäre, Fettextraktion des Autolysematerials dieses in ein von Jod unbeeinflußbares Material verwandeln. Diesbezügliche Versuche wurden angestellt. Die Autolyse wurde mit Hefe durchgeführt, was methodisch bedeutende Vorteile hat — es konnte in beliebiger Menge einheitliches, gut aufhebbares Material in Form der *Lebedeff*schen Trockenhefe beschafft werden, dadurch waren auch individuelle Schwankungen ausgeschlossen, die so sehr in der Arbeit *Kepinows* hervortreten. Was aber den Prozeß von Hefeautolyse selbst anbetrifft, so ist er nicht zu weit von der tierischen Proteolyse entfernt: die Antiprotease der Hefe hemmt auch die Trypsinwirkung[2]) und das Serumantitrypsin hemmt die Hefeendotryptasewirkung[3]). Da unsere Fragestellung

---

[1]) Arch. f. exper. Path. **53**, 1, 1905.

[2]) *Buchner* und *Haehn,* diese Zeitschr. **26**, 171.

[3]) *Kämmerer* und *Mogulesco,* Zeitschr. f. Immunitätsforsch. **12**, 16.

gerade auf die Jodwirkung des Antiferments hinauslaufen sollte, so schien uns der Ersatz von tierischem Autolysematerial durch Hefeautolyse gestattet.

Die Methodik

unserer Versuche war wie folgt: Genau abgewogene Mengen Trockenhefe (etwa 0,2 g) werden in kleine Erlenmeyerkölbchen eingetragen und mit wenig Wasser angerührt. Nach Zufügen von 2 bis 3 Tropfen 1proz. Stärkelösung wurde n/100 Jodlösung hinzugegeben, und zwar schußweise zu je 1 ccm, nachdem die Blaufärbung der vorhergehenden Portion verschwunden war. Dabei ging die Entfärbung immer langsamer vor sich. Wir fügten Jod hinzu, bis die Blaufärbung während 10 Minuten nicht mehr verschwand. Das Volumen wurde in allen Kölbchen auf 10 ccm gebracht und etwas Thymol als feines Pulver hinzugefügt. Die Portionen wurden verkorkt im Thermostaten bei 37° C der Autolyse überlassen. Wir benutzten Thymol als Antiseptikum, da ja Chloroform oder Toluol das Lipoidgleichgewicht der Zellen in *Joebling*schem Sinne beeinflussen könnte. Nach Verlauf der entsprechenden Zeiten wurde das ungespaltene Eiweiß nach *Barnstein*[1]) mit Kupfersulfatnatronlauge gefällt, die Flüssigkeit auf 50 ccm gebracht und durch einen kleinen Faltenfilter filtriert. In 10 ccm des Filtrats (gleich $^1/_5$ der Gesamtmenge) wurde der Stickstoff nach *Kjeldahl* bestimmt; als Vorlage dienten 3 ccm n/10 H_2SO_4, die Rückfiltrierung geschah mittels n/50 $Na_2S_2O_3$ nach Hinzufügen von KJO_3 und KJ. Einige Versuche wurden mit größeren Hefemengen durchgeführt, dann wurde mit n/20 Jodlösung jodiert, Ammoniak in n/10 H_2SO_4 aufgefangen und mit n/10 Natronlauge zurücktitriert. Wir verfügten über 3 Serien von Hefepräparaten. Die ersten zwei Präparate stammten vom Jahre 1922, das dritte, „Zymin", von ungefähr 1912. Es wurde in ihnen Gesamtstickstoff und Eiweißstickstoff mit folgendem Ergebnis bestimmt:

	Gesamtstickstoff %	Eiweißstickstoff %	Differenz %
Trockenhefe Nr. 5	9,14	7,52	1,62
„ „ 50	8,32	7,51	0,81
„Zymin"	7,71	6,51	1,20

Um die Präparate auf ihre autolytische Fähigkeit zu prüfen, wurden entsprechende, in Tabelle I zusammengefaßte Versuche angestellt:

[1]) Landw. Versuchsstation **54**, 327, 1900. Daß das Enteiweißungsverfahren durch Kupferhydroxyd bei Versuchen mit Hefeautolyse gut anwendbar ist, geht aus den Arbeiten von *Kostytschew* und *Brilliant* (Zeitschr. f. phys. Chem. **91**, 372) sowie von *Zalessky* und *Schataloff* (diese Zeitschr. **55**, 63) hervor.

Tabelle I.

1	2	3	4	5	6
Präparat	Abgewogene Hefemenge mg	N in Filtrat %	N in Filtrat %	Autolysiertes Eiweiß %	Dauer der Autolyse
Trockenhefe Nr. 5 .	244,0	12,6	5,17	47,2	49h 30′
„ „ 5 .	247,5	12,9	5,22	47,9	49 30
„ „ 50 .	210,0	11,0	5,24	59,0	46
„ „ 50 .	203,0	10,5	5,16	58,0	46
„Zymin“	201,0	11,2	5,57	67,2	50

Wie aus der Tabelle zu ersehen ist, autolysierten alle Hefeproben ziemlich stark. In den folgenden Tabellen geben wir nur die der Kolonne 5 der Tabelle I entsprechenden Zahlen an.

Einwirkung von Jod auf die Hefeautolyse.

Die Versuche werden mit dem Präparat Nr. 5 durchgeführt. Bei der oben besprochenen Jodbehandlung genügten bereits schon 2 ccm n/100 Jodlösung. Die Dauer der Autolyse betrug 23 Stunden.

Tabelle II.

Lit.	Milieu	Eiweißzerfall %	Relativer Zerfall
A	Wasser	37,3	100
B	„ + 2 ccm n/100 J	43,6	117

Es folgt aus dem Versuche, daß Jod die Autolyse fördert, die Zahlen entsprechen ungefähr denen von *Kaschiwabara* (l. c.) für Leberbrei.

Es sollte nun festgestellt werden, in welchem Sinne ein weiterer Jodzusatz die Autolyse beeinflußt. Die von uns angegebene Jodierungsmethode muß als eine äußerst vorsichtige bezeichnet werden, wodurch sie sich ganz prinzipiell von der *Kepinow*schen unterscheidet, es könnte nämlich ein weiterer Jodzusatz zu einer partiellen Jodierung des Substrates führen oder durch andere Eingriffe ein entgegengesetztes Resultat zeitigen.

Tabelle III.

Dauer der Autolyse bis 26 Stunden. Präparat Nr. 5.

Lit.	Milieu	Eiweißzerfall %	Relativer Zerfall
A	Wasser	38,1	100
B	„ + 1,0 ccm n/100 J	44,3	116
C	„ + 2,0 „ n/100 J	46,1	121
D	„ + 3,0 „ n/100 J	41,0	108

Tabelle IV.

Dauer der Autolyse bis 24 Stunden. Präparat Nr. 5.

Lit.	Milieu	Eiweißzerfall %	Relativer Zerfall
A	Wasser	36,9	100
B	„ + 1,5 ccm n/100 J	42,0	114
C	„ + 2,0 „ n/100 J	41,7	113

Tabelle V.

Lit.	Milieu	Eiweißzerfall %	Relativer Zerfall
A	Wasser	38,2	100
B	„ + 2,0 ccm n/100 J	43,2	113
C	„ + 2,5 „ n/100 J	36,9	97
D	„ + 3,0 „ n/100 J	36,1	95

Die angeführten Zahlen bestätigen einmal die Tabelle II und zeigen außerdem, daß ein weiterer Jodzusatz nicht eine weitere Förderung, sondern eine Hemmung der Autolyse nach sich zieht. Die anfänglich angewandte Jodkonzentration (2 ccm n/100 Jod) ist als optimale zu betrachten, was durch alle Versuche bestätigt werden konnte. Wodurch der beobachtete Umschlag von Förderung zur Hemmung bedingt wird, ist schwer zu entscheiden — wir haben es hier nicht mit einer Lösung zu tun, sondern mit einem heterogenen Gemisch, in welchem die Reaktion zwischen Jod und dem Substrat, auf welches es einwirkt, verschiedentlichen Einflüssen seitens anderer im Reaktionsmedium vorhandener Komponenten unterworfen sein kann. Es ist die Annahme nicht unberechtigt, daß bei Jodüberschuß eine langsam eintretende Jodierung des Eiweißsubstrates den Umschlag bedingt, dann müßte man sagen, daß Jod den fermentativen Abbauprozeß des normalen Eiweißsubstrates fördernd beeinflußt, aber jodiertes Eiweißsubstrat an und für sich von den Fermenten schwerer als normales angegriffen wird. Dieses stimmt auch mit den Resultaten von *Kepinow* (l. c.) über tryptische Verdauung jodierten Leberbreies überein.

Zur Bestätigung obiger Befunde stellen wir analoge Versuche mit Präparat Nr. 50 und mit „Zymin“ an. Die Jodierung dieser Präparate, besonders „Zymin“, geht viel langsamer vor sich. Die Ergebnisse sind aus Tabelle VI und VII zu ersehen. Es sei besonders hervorgehoben, daß das Maximum der Autolyseförderung nicht bei 2 ccm, sondern schon bei 1 ccm Jodzusatz liegt, wonach scharf ausgesprochene Hemmung eintritt. Außerdem ist die Förderung in viel geringerem Maße ausgesprochen wie bei Präparat Nr. 5.

Tabelle VI.

Dauer der Autolyse bis 68 Stunden. Präparat Nr. 50.

Lit.	Milieu	Eiweißzerfall %	Relativer Zerfall
A	Wasser	57,7	100
B	„ + 1,0 ccm n/100 J	61,7	107
C	„ + 2,0 „ n/100 J	54,9	95
D	„ + 3,0 „ n/100 J	49,5	86

Tabelle VII.

Dauer der Autolyse bis 67 Stunden. „Zymin".

Lit.	Milieu	Eiweißzerfall %	Relativer Zerfall
A	Wasser	56,2	100
B	„ + 1,0 ccm n/100 J	58,0	103
C	„ + 2,0 „ n/100 J	53,1	94
D	„ + 3,0 „ n/100 J	45,1	80

Besonders schwach wird die „Zymin"-Autolyse durch Jod beeinflußt. Wie aus dem Vergleich von Tabelle I mit den Tabellen II bis VII zu ersehen ist, steht überhaupt die Intensität des fördernden Jodeffekts auf die Autolyse im umgekehrten Verhältnis zur autolysierenden Fähigkeit des Hefepräparates. Diese Tatsache lockt uns wieder zu den *Jobling*schen Konzeptionen: Je weniger Antiprotease (ungesättigte Fettsäure), desto weniger kann Jod etwas ausrichten, je weniger Antiprotease, desto stärker aber die ursprüngliche Proteolyse.

Aber auch an eine andere Erklärungsmöglichkeit dieser Beobachtung muß gedacht werden, die überhaupt die Spezifität der Jodierung auf die Autolyse in Frage stellt. Wie bekannt, liegt das Reaktionsoptimum für die Autolyse in saurer Lösung; wir bestimmten nicht den Aziditätsgrad unserer Präparate, es ist aber anzunehmen, daß das während 10 Jahren im Laboratorium aufgehobene „Zymin" saurer ist als die anderen Präparate. Wir wissen nicht, *was* durch Jodzusatz „*jodiert*" wird, sollten es aber Eiweißkomponenten oder eiweißartige Körper sein, so erfolgt die Reaktion mit einer Säurebildung nach der Gleichung: $RH + J_2 = RJ + HJ$; zwecks Wegräumen saurer Produkte wird deshalb bei Eiweißjodierung Alkali zugesetzt. Sollte also auch in unserem Falle die anfängliche Jodierung zur Bildung von Jodwasserstoffsäure führen, dann könnte überhaupt die ganze fördernde Wirkung von Jod auf Autolyse durch Verschiebung der Wasserstoffionenkonzentration nach der für die Autolyse optimalen Seite erklärt werden. Um die Frage experimentell zu prüfen, gaben wir in einer Versuchsreihe zu den Kontrollkölbchen Säure hinzu im Verhältnis eines halben Jodäquivalentes, entsprechend der angeführten Gleichung. Statt Jodwasserstoffsäure nahmen wir die zugänglichere Chlorwasser-

stoffsäure, da beide Säuren ungefähr gleich dissoziiert sind. Es wurde in diesem Falle mit größeren Mengen (etwa 1 g) des Präparates Nr. 5 gearbeitet. Die Resultate sind in Tabelle VIII zusammengestellt.

Tabelle VIII.

Dauer der Autolyse bis 25 Stunden. Präparat Nr. 5.

Lit.	Milieu	Eiweißzerfall %	Relativer Zerfall
A	Wasser + 2 ccm n/40 HCl	41,9	100
A	„ + 2 „ n/40 HCl	41,7	100
B	„ + 2 „ n/20 J .	50,4	119
B	„ + 2 „ n/20 J .	49,5	119

Nachdem *Zalessky*[1]) festgestellt hatte, daß dem KJ eine fördernde Wirkung auf die Hefeautolyse zukommt, mußte auch geprüft werden, ob der geringe Jodkaliumgehalt (0,04% KJ bei optimaler Jodkonzentration) der gebrauchten Jodlösung die Verstärkung der Autolyse bedingen konnte.

Wie aus der Tabelle IX zu ersehen ist, genügen diese Jodkaliumkonzentrationen in keiner Weise, um die Autolyseverstärkung zu erklären. Im Gegenteil, es scheint sogar eine geringe Hemmung zu bestehen.

Tabelle IX.

Dauer der Autolyse bis 46 Stunden.

Lit.	Milieu	Eiweißzerfall %
A	Wasser	43,7
B	„ + 1,0 ccm 0,2 proz. JK	41,7
C	„ + 2,0 „ 0,2 „ JK	41,6

Aus den Versuchen geht hervor, daß die fördernde Jodwirkung auf die Autolyse weder durch eine Säurewirkung, noch durch den Jodkaliumgehalt der Jodlösung erklärt werden kann, daß im Gegenteil *Jod eine spezifische Wirkung bei der Autolyse zukommt.*

Kann die Jodwirkung auf die Autolyse durch Brachlegung der Antiprotease (ungesättigte Fettsäure) nach *Jobling* erklärt werden?

Wie schon mehrfach erwähnt, könnte eventuell die Jodwirkung auf die Autolyse eine Erklärung durch die *Jobling*sche Theorie finden. Sollten den ungesättigten Fettsäuren auch bei autolysierten Prozessen die Bedeutung von Antiproteasen zugeschrieben werden können, dann wäre die Jodierung des Autolysenmaterials mit einer Absättigung der doppelten Bindungen durch Jod und also mit einer Freilegung der

[1]) *Zalessky* und *Schataloff*, diese Zeitschr. **69**, 294, 1915.

proteolysierten Wirkung verbunden. Wäre dem so, dann müßte, entsprechend den *Jobling*schen Versuchen mit verkästem Drüsenmaterial, bei Fettextraktion der Hefe einmal die absolute Stärke des Autolysenprozesses anwachsen, zweitens aber auch die Jodwirkung verschwinden. Entsprechende Versuche wurden von uns angestellt.

Wir extrahierten Trockenhefe 24 Stunden mit Chloroform im Soxhletapparat, wonach das Chloroform aus dem Hefematerial durch Trocknen bei niedriger Temperatur entfernt wurde. Mit der so vorbehandelten Hefe wurden die oben erwähnten Versuche angestellt. Zwei Versuchsreihen sind in Tabelle X und XI zusammengefaßt.

Tabelle X.

Dauer der Autolyse bis 42 Stunden.

Lit.	Milieu	Präparat Nr. 5 extrahiert		Präparat Nr. 50 extrahiert	
		Eiweißzerfall %	Relativer Zerfall	Eiweißzerfall %	Relativer Zerfall
A	Wasser	44,5	100	47,5	100
B	„ + 1 ccm n/100 J	47,7	107	50,0	105
C	„ + 2 „ n/100 J	50,6	114	43,3	91
D	„ + 3 „ n/100 J	43,5	98	37,0	78

Tabelle XI.

Dauer der Autolyse bis 45 Stunden.

Lit.	Trockenhefe Nr. 5	Eiweißzerfall %
A	Nicht extrahiert . . .	44,6
B	Extrahiert	44,5

Wie ersichtlich, blieb also trotz Chloroformextraktion der Hefe die fördernde Jodwirkung auf die Autolyse erhalten, das extrahierte Material autolysierte ebenso stark wie das nicht extrahierte. Man könnte vielleicht glauben, daß das Chloroform keine Fettsubstanzen mit doppelter Bindung extrahiert hätte — unsere Versuche lehrten das Gegenteil. Wir bestimmten den absoluten Gehalt der Hefeproben an mit Chloroform extrahierbaren Substanzen und die Jodzahlen der Extrakte. Daraus wurde berechnet, wieviel Jod notwendig ist, um die doppelten Bindungen von in 1 g Hefe enthaltenden Fettsubstanzen zu sättigen. Die diesbezüglichen Zahlen sind in Tabelle XII gegeben.

Tabelle XII.

Präparat	Fettgehalt %	Jodzahl	mg J notwendig um die doppelten Bindungen von 1 g Hefe zu sättigen
Trockenhefe Nr. 5	1,48	78,8	11,7
„ „ 50	1,75	87,3	15,1

Wie wir sehen, ist keinerlei Beziehung zu entdecken zwischen der zur Absättigung der doppelten Bindungen der Extrakte nötigen Jodmenge und derjenigen, die gerade noch die Autolyse fördert. Möglich ist es ja, daß durch die auch noch so lange Chloroformextraktion nicht alle Fett- und Lipoidsubstanzen entfernt werden; zur Lösung der Lipoideiweißbindungen gehören schärfere Eingriffe, welche das Ferment zerstören würden. Immerhin zeigt das Chloroformextrakt eine Jodzahl, enthält also ungesättigte Bindungen in der Fettfraktion; sollte die *Jobling*sche Theorie in unserem Falle anzuwenden sein, dann *müßte* der zu erwartende Effekt nach Extraktion der Hefe eintreten — dieses war nicht der Fall.

Um das Kapitel der ungesättigten Fettsäureseifen nicht unberücksichtigt zu lassen, welche bei den Trypsin-Caseinversuchen *Joblings* im Reaktionsmedium als Antiproteasen fungierten, stellten wir entsprechende Versuche bei der Hefeautolyse an. Wir beobachteten die Autolyse bei Zusatz von oleinsaurem und palmitinsaurem Natron. Es trat allerdings eine Hemmung, und zwar unabhängig von der doppelten Bindung, in beiden Fällen ein. Es stellte sich heraus, daß die starke Hydrolyse der Seifen in wässeriger Lösung zu einer gewaltigen Anreicherung des Milieus an Hydroxylionen führt, was auch sofort die Arbeit des Ferments beeinflußt. Solche Versuche können natürlich nur unter steter Kontrolle der Wasserstoffionenkonzentration durchgeführt werden, was, wie es übrigens scheint, von *Jobling* unterlassen wurde.

Auch noch von einer anderen Seite versuchten wir der Frage beizukommen, um mögliche Beziehungen zwischen der Einwirkung von Jod auf die Autolyse und der *Jobling*schen Theorie aufzudecken. Wie bereits eingangs erwähnt, hemmt Serum die Autolyse (*Baer* und *Loeb*, l. c.), was durch den Antiproteasegehalt des Serums erklärt wird. Sollte Serumantiprotease durch Chloroformbehandlung brachgelegt werden, wie *J. Jobling*[1]) angibt, dann müßte im Einklang mit seinen Konzeptionen chloroformbehandeltes Serum nicht mehr die Autolyse hemmen können.

Um die Säurewirkung der Hefen auf die Antiprotease auszuschließen, um den Prozeß in einem für das Serum verwendeten Milieu einzuteilen, arbeiteten wir in gepufferter Lösung (Phosphat; $p_H = 7{,}35$). Serum wurde ganz genau nach *J. Jobling*[1]) mit Chloroform behandelt, in die Kontrolle gelangte nur Chloroform ohne Serum, der zweite Versuch lief mit Chloroformzusatz ohne Serumbehandlung, wobei eben so viel Chloroform als Unterschichtung in das Kölbchen gelangte. Das weitere ist aus Tabelle XIII zu ersehen.

---

[1]) *Jobling, Petersen* und *Eggstein,* Zeitschr. f. Immunitätsforsch. **24,** 460, 1916.

Tabelle XIII.

Dauer der Autolyse bis 24 Stunden. Trockenhefe Nr. 50.

Lit.	Milieu	Eiweißzerfall %	Relativer Zerfall
A	Wasser + Chloroform	26,3	100
B	„ + 2 ccm Ser. + Chloroform .	22,4	85
C	„ + 2 ccm Chloroformbehandl., Serum	22,1	84

Der Stickstoff des Serums wurde natürlich in Rechnung genommen. Der Versuch wurde mit verschiedenen Abänderungen vielmals wiederholt, wobei auf Lit. B, auch ohne Chloroformzusatz durchgeführt, mehr Chloroform genommen wurde usw. Das Ergebnis war immer dasselbe: Serum hemmt die Autolyse in gleichem Maße, ob es mit Chloroform behandelt wurde. Somit ist auch von dieser Seite her keinerlei Beziehung zwischen der Jodierung der Autolyse und den von *J. Jobling* beobachteten Tatsachen zu entdecken. Die Autolyse wird durch Jod deshalb nicht gefördert, weil das Jod ungesättigte Fettsäurebindungen belegt. Aus allen dargelegten Beobachtungen muß der Schluß gezogen werden, daß entweder die *Jobling*sche Theorie nicht auf die Autolyse angewendet werden kann, oder daß sie an und für sich richtige Beobachtungen, aber falsche Interpretationen in sich birgt. In einer der nächsten Mitteilungen werden wir Gelegenheit haben, darauf näher einzugehen.

Zusammenfassung.

1. Unter Beibehaltung bestimmter Konzentrationsverhältnisse fördert Jod die Hefeautolyse.

2. Bei weiterem Jodzusatz tritt eine Hemmung ein, was wahrscheinlich durch die Jodierung des Substrates erklärt werden muß.

3. Der fördernde Einfluß von Jod auf die Autolyse kann nicht durch die *Jobling*sche Theorie der antitryptischen Wirkung ungesättigter Fettsäuren erklärt werden.

Zur Theorie der Desinfektion[1].

Von

Walter Schoeller und Adolf Heck.

(Aus der medizinisch-chemischen Abteilung des chemischen Instituts Freiburg i. Br.)

(Eingegangen am 28. Mai 1923.)

Mit 2 Abbildungen im Text.

1. Zur Einleitung.

In ihren klassischen Untersuchungen haben *Paul* und *Krönig* (1) gezeigt, daß die Desinfektionskraft der Schwermetallsalze, z. B. die des Quecksilbers mit dem Gehalt seiner wässerigen Lösung an Quecksilberionen parallel geht. Sie fanden nämlich, daß der Zusatz biologisch indifferenter Elektrolyte die Desinfektionswirkung in dem gleichen Maße herabzusetzen vermag, wie die elektrolytische Dissoziation der betreffenden Quecksilbersalze dabei zurückgedrängt wird, und daher sprechen *Paul* und *Krönig* folgerichtig die Quecksilberionen als die eigentlichen Träger der Desinfektionswirkung an.

Die Frage, wieweit sich die *organischen* Quecksilberverbindungen in das *Paul* und *Krönig*sche Gesetz einbeziehen lassen, ist von *Schrauth* und *Schoeller* (2) einer eingehenden Prüfung unterzogen worden. Ausgehend von der Oxy-Quecksilberbenzoesäure

CO_2H

(Benzolring)—Hg.OH

als Grundtyp konnten diese Autoren zeigen, daß dem Quecksilber trotz seiner Komplexbindung an dem Benzolkern genügend „*Restaffinität*“ verblieben ist, um biologische Wirkungen gegenüber pathogenen Keimen äußern zu können. Diese Verbindungen stehen in ihren besten Vertretern an Desinfektionsvermögen dem Sublimat kaum nach, obwohl eine wässerige Lösung derselben keine Quecksilberionen zu bilden

[1]) Vorgetragen auf der Vereinigung Südwestdeutscher Hochschullehrer der Chemie zu Heidelberg; 22. April 1923.

vermag und demzufolge weder Metalle amalgamiert noch Eiweißlösungen koaguliert.

Ihre Dissoziation ist vielmehr aufzufassen als ein Gleichgewicht mehrerer Dissoziationszustände, welche sich, um bei dem Beispiel des oxy-quecksilber-benzoesauren Natriums zu bleiben, durch folgende Schemata wiedergeben läßt.

$$\text{I. } NaO_2C.C_6H_4.HgOH \rightleftarrows Na^+ + {}^-O_2C.C_6H_4.HgOH$$
$$\text{II. } NaO_2C.C_6H_4.HgOH \rightleftarrows NaO_2C.C_6H_4.Hg + OH^-$$
$$\text{III. } NaO_2C.C_6H_4.HgOH \rightleftarrows Na^+ + {}^-O_2C.C_6H_4.Hg^+ + OH^-$$

Es handelt sich in vorliegendem Falle um die Dissoziation eines amphoteren Elektrolyten mit wahrer Salzbildung in bezug auf seine Natur als Säure. Denn bei der Elektrolyse wandern das Natriumion und das Komplexion $NaO_2CC_6H_4Hg^+$ zur Kathode, wobei im Kathodenraum alsdann unter stark alkalischer Reaktion die Reduktion des Komplexions durch naszierenden Wasserstoff erfolgt, so daß auch metallisches Quecksilber kathodisch abgeschieden wird. An der Anode tritt Sauerstoffentwicklung ein unter gleichzeitiger Abscheidung eines weißen Niederschlages, welcher aus dem Anhydrid der betreffenden Verbindung besteht. Die Existenz der Dissoziationsstufe III konnte experimentell mit Sicherheit nicht nachgewiesen werden, da sie wohl nur in recht geringem Maße vorhanden ist. Die Gleichgewichtskonstante der einzelnen Phasen I und II zu bestimmen, begegnete schon bei der elektrometrischen Messung der OH-Ionenkonzentration Schwierigkeiten, die uns veranlaßten, diese Frage vorläufig zurückzustellen. Durch Leitfähigkeitsmessungen ließ sich aber immerhin zeigen, daß das Gleichgewicht des Schemas I bevorzugt ist.

Tabelle I.

Conc.	n/160 = 0,125 % Hg							n/80 = 0,25 % Hg		
CO_2Na-C_6H_4-X	X = -HgOH	-HgBr	-HgCl	-Hg·NH2 1.)	-HgJ	-HgCN	-Hg-N<CO 2.) CO	-Hg>S -Hg	-HgS2O3Na	C-Hg-C 3.)
2 Min.	x	x								
4 "										
6 "			x	x						
8 "										
10 "					x	x	x			
12 "										
14 "										
16 "										
18 "										
>20 "								x	x	x

1.) Aminosäuren 2.) Veronalrest 3.) Hg-Dibenzoësäure

Schrauth und *Schoeller* konnten nun feststellen, daß die Desinfektionskraft in dem Maße abnimmt, als die am Quecksilber haftende Hydroxyl-

gruppe durch andere negative Reste ersetzt wird, welche weniger Tendenz zur Bildung der Dissoziationsstufe II aufweisen. Der Wirkungsgrad fällt bei dem Ersatz des OH durch Br, Cl, N-haltige Reste über J, CN und Schwefelverbindungen steil ab, um schließlich gänzlich geschwunden zu sein, wenn die zweite Valenz des Quecksilbers ebenfalls komplex an einen elektronegativen organischen Rest gebunden ist, wie etwa in der Quecksilber-Dibenzoesäure der Formel: $HO_2C.C_6H_4.Hg.C_6H_4.COOH$. Aus der folgenden Tabelle ist dies leicht zu ersehen.

Es hat somit den Anschein, als ob das Dissoziationsgleichgewicht des Schemas II für das Zustandekommen der biologischen Wirkung von Bedeutung ist, denn in dem Maße, als die Möglichkeit zu seiner Bildung abnimmt, sehen wir auch die Desinfektionskraft abnehmen. Es liegen also hier Beziehungen vor, die mit den von *Paul* und *Krönig* an Salzen gefundenen Gesetzmäßigkeiten eine befriedigende Analogie aufweisen, wenngleich, wie gesagt, keine Quecksilberionen in der Lösung vorhanden sind.

Fernerhin haben aber *Schoeller* und *Schrauth* (3) im Verlauf ihrer Untersuchungen noch auf das Vorhandensein eines zweiten Faktors hingewiesen, der sich indessen nicht mehr in das *Paul* und *Krönig*sche Gesetz einbeziehen läßt. Durch neu in den Benzolkern eintretende Substituenten nämlich wird die Desinfektionskraft der Oxy-Quecksilber-Benzoesäure bzw. ihres Natriumsalzes vermehrt oder vermindert im Sinne der nachfolgenden Tabelle II. Unter Zeit ist diejenige Anzahl von Minuten verstanden, in welcher Staphylokokken, die auf gerauhten Glasperlen aufgetrocknet waren, von den wässerigen Lösungen der Präparate in n/80 Konzentration abgetötet werden. Die chemischen Symbole bedeuten den Substituenten, der jeweils in das Molekül der Oxy-Quecksilber-Benzoesäure eingetreten ist.

Wir sehen aus dieser Tabelle deutlich den verbessernden Einfluß des neu in den Kern eintretenden Halogens oder Alkyls bzw. Oxalkyls, wobei interessanterweise sogar die Stellung im Benzolkern einen Unterschied in der biologischen Wirkung bedingt. Andererseits fällt es auf, wie sehr negative oder positive salzbildende Gruppen den Wirkungsgrad verschlechtern, doch zeigt sich wiederum deutlich bei den Alkylderivaten der Oxy-Quecksilber-Anthranilsäure der bessernde Einfluß des Alkyls.

Damit ist sofort ersichtlich, daß es sich bei der Einwirkung des Desinfiziens auf die Bakterie nicht um chemische Kräfte handelt, etwa im Sinne einer Salzbildung bzw. Bindung nach Art der Komplexsalze, wie *Karrer* (4) sich die Einwirkung des Salvarsans auf das Treponema pallidum vorstellt. So war die Frage um so interessanter, welche physikalisch chemischen Faktoren hier bestimmend eingreifen; denn wenn es gerade die chemisch indifferenten Gruppen sind, welche die biologische Wirkung steigern, so lag es nahe, an die Beziehungen zur

Narkose zu denken. Auch dort vermögen Alkylgruppen die Wirkung bekanntlich erheblich zu steigern, während Sulfogruppen und andere die Hydratation begünstigende Substituenten sie herabsetzen. Nun ist der Teilungskoeffizient im Sinne der *Hans Horst Meyer* und *Overton*-schen Theorie im vorliegenden Falle in der Entfaltung seines Einflusses gehemmt, da die hier verglichenen Oxy-Quecksilber-Carbonsäuren als Natriumsalze zwar eine sehr große Wasserlöslichkeit, aber nur eine recht geringe Löslichkeit in organischen Solvenzien besitzen, selbst nicht einmal in Methyl- oder Äthylalkohol.

Tabelle II.

Conc.	n/80 = 0,25 % Hg											
Stellung			ortho	o	o	o	para	o	1:2:4	o	o	o
X – Na CO_2 – HgOH	Vergleich mit $HgCl_2$	X·H	-Cl	-J	$-CH_3$	$-OCH_3$	$-OCH_3$	-OH	-OH $-SO_3H$	$-NH_2$	$-NH \cdot CH_3$	$-N(CH_3)_2$
2 Min.			×									
4 „												
6 „	×				×	×						
8 „												
10 „												
12 „												
14 „												
16 „				×			×					
18 „												
20 „		×										
30 „												×
1 h											×	
2 „												
3 „										×		
4 „								×	×			

Es erschien uns somit als die aussichtsreichste Aufgabe, den Anschluß an die Vorstellungen zu suchen, welche neuerdings *Otto Warburg* (5) von der *Narkose* entwickelt hat. Er sieht ihr Wesen in der Verdrängung des Substrates von katalytisch wirkenden Oberflächen, und demzufolge besteht nach seinen Untersuchungen bei den Narkotika ein weitgehender Parallelismus zwischen Adsorption und Wirkungsstärke, der sich im Modellversuch z. B. gegen Tierkohle nachprüfen läßt. Wir haben deshalb zunächst die Adsorption des oxy-quecksilbertoluylsauren Natriums (*Afridol, Bayer*) gegen wechselnde Mengen Tierkohle untersucht und die so gewonnenen Resultate mit anderen Vertretern der Tabelle II von geringerer biologischer Wirksamkeit verglichen.

2. Versuchsanordnung.

Bei allen Versuchen kam als Adsorbens „Carbo medicinalis, *Merck*" zur Verwendung von etwa 30 % Wassergehalt, welche sich von genügender Reinheit erwies. Die Lösungen der Natriumsalze der ver-

schiedenen Oxy-Quecksilber-Carbonsäuren waren in der Weise hergestellt worden, daß die zugehörigen Anhydride im analysenreinen Zustand in geringem Überschuß abgewogen, in der gewünschten Menge n/80 Alkali gelöst und filtriert wurden, um einen Überschuß von freiem Alkali tunlichst zu vermeiden.

50 ccm der jeweils zu prüfenden Lösung wurden mit der genau gewogenen Kohlenmenge 10 Minuten auf der Maschine geschüttelt und nach halbstündigem Stehen Proben zur Analyse abfiltriert. Zur Feststellung der in der Lösung verbliebenen Anteile lassen sich teils Titrations-, teils gravimetrische Bestimmungen verwenden.

Die Möglichkeit einer Titration ergibt sich aus den folgenden Beziehungen. Wird eine Lösung von oxy-quecksilber-toluylsaurem Natrium mit Jodnatrium im Überschuß versetzt, so geht die Verbindung quantitativ im Sinne der folgenden Gleichung in das Jodnatrium-Komplexsalz der betreffenden Jodquecksilbertoluylsäure über, unter Abspaltung *eines* Moleküls Alkali.

$$CH_3 \cdot C_6H_3(CO_2Na)(HgOH) + 2\,NaJ = CH_3 \cdot C_6H_3(CO_2Na)(Hg \cdot J_2 \cdot Na) + NaOH \qquad 1)$$

Afridol

Dieses abgespaltene Molekül Natronlauge ist mit Schwefelsäure und Phenolphthalein als Indikator titrierbar, ohne daß die komplexe Quecksilberverbindung sich störend bemerkbar macht. Unter den wichtigsten merkurierten Carbonsäuren haben wir zunächst nur die folgenden ausgewählt, um feststellen zu können, ob der Einfluß der *Nebengruppierung* auf die Desinfektionskraft mit den Ergebnissen der Adsorptionsversuche übereinstimmen würde.

Tabelle III.

Nr.	Name	Löslich machende Gruppe	Neben- gruppierung	Stellung im Benzolkern
1	Oxy-quecksilber-benzoesaures Na	— COONa	— H	ortho
2	Oxy-quecksilber-o-toluylsaures Na (Afridol)	— COONa	— CH_3	„
3	Oxy-quecksilber-anthranilsaur. Na	— COONa	— NH_2	„
4	Oxy-quecksilber-salicylsaures Na	— COONa	— OH	„

Das verwendete Verfahren möge am Beispiel einer nahezu n/80 Afridollösung geschildert werden. Zunächst wurde der Titer der Lösung ermittelt, wobei 10 ccm der Ausgangslösung z. B. 8,50 ccm n/80 Schwefelsäure bis zur eben beginnenden schwachsauren Reaktion verbrauchten. Von dieser Lösung wurden 50 ccm 10 Minuten mit 0,25 g Kohle auf der Maschine geschüttelt und nach halbstündigem Stehen abfiltriert.

Während die ursprüngliche Afridollösung gegen Phenolphthalein praktisch nicht ansprach, zeigte der Indikator nunmehr *kräftige alkalische Reaktion* an. Dieser Überschuß an freiem Alkali wurde in Proben von je 10 ccm zurücktitriert und verbrauchte im Durchschnitt 2,00 ccm n/80 Schwefelsäure. Eine so neutralisierte Lösung nimmt auf Zusatz von überschüssigem Jodnatrium, entsprechend dem der Lösung noch verbliebenen Restgehalt an nicht adsorbiertem Afridol, im Sinne der obigen Gleichung 1) abermals alkalische Reaktion an, was sich sofort in starkem Ansprechen des Indikators anzeigt. Auch dieses Quantum Alkali haben wir mit n/80 Schwefelsäure titriert, wozu im Durchschnitt 3,70 ccm erforderlich waren.

Aus dem Auftreten von *freiem Alkali* nach dem Schütteln mit Kohle, das sich in diesen sowie in allen folgenden Versuchen in wechselnden Mengenverhältnissen zeigte, geht deutlich hervor, daß die verwendeten komplexen Quecksilberverbindungen nicht lediglich eine *molekulare* Adsorption erfahren, sondern neben den adsorbierten Molekülen der Natriumsalze der Oxy-Quecksilber-Carbonsäuren müssen zum Teil auch deren *Anhydride* im Sinne des folgenden Schemas adsorptiv gebunden sein, wenn freies Alkali in der Lösung verbleiben soll.

$$X + Y + Z \; C_6H_3(CH_3)(CO_2Na)(HgOH) \;\longrightarrow\; \underbrace{X \; C_6H_3(CH_3)(CO_2Na)(HgOH) + Y \; C_6H_3(CH_3)\left<\begin{matrix}C{=}O \\ | \;\; O \\ Hg\end{matrix}\right.}_{\text{adsorbiert}} \qquad 2)$$

(links: geschüttelt; rechts: (*Anhydrid*))

$$\underbrace{+ \; Y\,NaOH + Z \; C_6H_3(CH_3)(CO_2Na)(HgOH)}_{\text{in Lösung}}$$

Entsprechend den titrimetrisch ermittelten Werten enthält das Adsorbat somit 56,4 % der angewendeten Substanzmenge, wovon 23,5 % in Form des Anhydrids gebunden sind, während sich in der Lösung noch 43,6 % der ursprünglichen Quecksilberverbindung befinden und außerdem 23,5 % freies Alkali.

Ähnliche Spaltungen von adsorbierten Molekülen sind auch von anderen Autoren beobachtet worden, so speziell von *H. Freundlich* (6) bei der Aufnahme basischer Farbstoffe. Daß in unserem Falle aber die Lösung alkalischen Charakter annimmt, steht im Widerspruch zu den Anschauungen von *L. Michaelis* (7), welcher der Kohle nach den bisherigen Erfahrungen geradezu einen Neutralisationseffekt zuschreibt.

Über diese Divergenz Klarheit zu schaffen, soll indessen einer besonderen Untersuchung vorbehalten bleiben. Da die Versuche an den anderen Quecksilberpräparaten analoge Ergebnisse erbracht haben, so wählen wir zu ihrer Darstellung die Form der nachstehenden vier Tabellen.

In den einzelnen Spalten der vorstehenden Tabellen sind aufgeführt die angewendete Kohlenmenge m in Grammen, die in 50 ccm Lösung enthaltene Substanzmenge a in Millimolen, die adsorbierte Stoffmenge x in Millimolen, die Gleichgewichtskonzentration c, ferner die gefundenen und nach der Adsorptionsisotherme $x/m = k.c$ berechneten x/m-Werte und schließlich die Konstante k obiger Formel.

Gemäß der verschiedenen Adsorptionen der untersuchten Verbindungen als *Molekül*- und als *Anhydrid*anteil gelten für jeden Stoff zwei untereinanderstehende Tabellen.

8. Deutung der Versuchsergebnisse.

Ein Vergleich der in den vorstehenden Tabellen enthaltenen Versuchsergebnisse zeigt, daß die *Gesamtadsorption* der Präparate, gleiche Konzentration vorausgesetzt, einen ziemlich konstanten Wert besitzt, welcher im Durchschnitt für n/80 Lösungen 80% nahekommt; nur das Afridol zeigt hier merkwürdigerweise einen kleineren Wert. Betrachten wir hingegen die Tendenz, Alkali abzuspalten und als Anhydride die adsorptive Bindung einzugehen, so sehen wir, daß diese vom Salicylsäure- über das Anthranilsäure-Derivat zum Afridol ansteigt.

Um indessen von der prozentualen Adsorption unabhängig zu sein, welche für den molekularen und Anhydridanteil nur relativ kleine Unterschiede anzeigt, haben wir an Hand obigen Zahlenmaterials die Gültigkeit der *Freundlich*schen Adsorptionsisotherme $x/m = k.c^n$ nachgeprüft. Die Konstante k stellt dann ein zuverlässiges Maß für die Adsorption dar, denn sie ist es, welche die subjektiven Einflüsse des adsorbierten sowie adsorbierenden Stoffes enthält und wiedergibt.

Tabelle IV. Oxy-quecksilber-toluylsaures Natrium (Afridol, Bayer).

Kohlemenge m	50 ccm Lösung enthält a Millimole Substanz	Adsorbierte Substanzmenge x	Gleichgewichtskonstante c	Adsorbiert pro 1 g Kohle		Adsorptionskonstante
				x/m gef.	x/m ber.	
			a) Gesamtadsorption.			
0,25	0,5310	0,2995	0,01157	1,195	1,195	$k_0 = 3,15$
0,20	0,2650	0,1880	0,00390	0,940	0,940	
0,10	0,1325	0,0860	0,00230	0,860	0,805	
			b) Anhydridadsorption.			
0,25	0,5310	0,1320	0,01157	0,528	0,528	$k = 2,88$
0,20	0,2650	0,0750	0,00390	0,370	0,345	
0,10	0,1325	0,0370	0,00230	0,370	0,288	

Tabelle V. Oxy-quecksilber-benzoesaures Natrium.

Kohlemenge m	50 ccm Lösung enthält a Millimole Substanz	Adsorbierte Substanzmenge x	Gleichgewichtskonstante c	Adsorbiert pro 1 g Kohle x/m gef.	x/m ber.	Adsorptionskonstante
		a) Gesamtadsorption.				
0,25	0,394	0,303	0,0045	1,210	1,07	$k_0 = 3{,}5$
0,20	0,197	0,160	0,0018	0,80	0,97	
0,10	—	—	—	—	—	
		b) Anhydridadsorption.				
0,25	0,394	0,086	0,0045	0,34	0,33	$k = 3{,}0$
0,20	0,197	0,040	0,0018	0,24	0,24	
0,10	—	—	—	—	—	

Tabelle VI. Oxy-quecksilber-anthranilsaures Natrium.

Kohlemenge m	50 ccm Lösung enthält a Millimole Substanz	Adsorbierte Substanzmenge x	Gleichgewichtskonstante c	Adsorbiert pro 1 g Kohle x/m gef.	x/m ber.	Adsorptionskonstante
		a) Gesamtadsorption.				
0,25	0,496	0,3835	0,00563	1,565	1,56	$k_0 = 7{,}0$
0,20	0,248	0,2130	0,00175	1,065	1,11	
0,10	0,109	0,0946	0,00073	0,946	1,08	
		b) Anhydridadsorption.				
0,25	0,496	0,1240	0,00563	0,496	0,496	$k = 1{,}92$
0,20	0,248	0,0694	0,00175	0,347	0,345	
0,10	0,109	0,0298	0,00073	0,298	0,273	

Tabelle VII. Oxy-quecksilber-salicylsaures Natrium.

Kohlemenge m	50 ccm Lösung enthält a Millimole Substanz	Adsorbierte Substanzmenge x	Gleichgewichtskonstante c	Adsorbiert pro 1 g Kohle x/m gef.	x/m ber.	Adsorptionskonstante
		a) Gesamtadsorption.				
0,25	0,6125	0,490	0,00613	1,960	1,960	$k_0 = 7{,}74$
0,20	0,3200	0,280	0,00201	1,400	1,450	
0,10	0,1575	0,129	0,00142	1,290	1,320	
		b) Anhydridadsorption.				
0,25	0,6125	0,1097	0,00613	0,438	0,438	$k = 1{,}49$
0,20	0,3200	0,0670	0,00201	0,335	0,342	
0,10	0,1575	0,0310	0,00142	0,310	0,310	

In der obigen Formel bedeutet x die adsorbierte Substanzmenge in Millimolen, m die Menge des Adsorbens in Grammen, c die Gleichgewichtskonzentration, k und n sind empirische Konstanten. Die aus den Versuchen sich ergebenden Werte für x/m und c wurden in ein logarithmisches Netz eingetragen und aus der resultierenden Geraden die Konstante n, die Tangente des Winkels, den die Gerade mit der Abszisse bildet, ermittelt. Die Konstante k wird aus der logarithmierten Adsorptionsgleichung berechnet. Mit Hilfe dieser Kon-

stanten sind die in obigen Tabellen angeführten x/m-Werte abgeleitet. Der Vergleich der gefundenen und errechneten x/m-Werte beweist die Gültigkeit der Adsorptionsisotherme innerhalb des von uns untersuchten Gebiets.

Übertragen wir die in vorstehenden Tabellen wiedergegebenen Erfahrungen über den Adsorptionsvorgang der vier organischen Quecksilberverbindungen auf das Phänomen der Desinfektion, so ergibt sich das folgende Bild. Auch die Bakterien bzw. ihre Spore wird offenbar zweierlei Adsorptionsweisen ausüben können, indem sie auf ihrer Oberfläche einerseits *Moleküle*, andererseits aber deren *Anhydride* adsorbiert. Diese beiden Adsorptionen sind *biologisch nicht gleichwertig*, denn erstere ist reversibel, letztere aber nicht. Wird das Testobjekt nach der Einwirkung des Desinfiziens in bekannter Weise mehrfach und gründlich mit reinem Wasser nachgewaschen, so können die Moleküle der adsorbierten Alkalisalze leicht wieder in Lösung gehen, da ihre Adsorption, wie alle echte, reversibel ist. Indessen ist der als Anhydrid adsorbierte Anteil in Wasser wie auch in organischen Solvenzien praktisch unlöslich und somit *irreversibel* auf der Zelloberfläche gebunden.

Hier scheint uns das Moment gegeben, welches der Träger der biologischen Wirkung ist. Die Konstanten k nämlich der irreversiblen Adsorption der Anhydridanteile müssen wir demzufolge als ein zuverlässiges Maß für die Ursache der biologischen Wirkung ansprechen. Wenn wir uns auch darüber klar sind, daß die Zellhaut bzw. Plasmahaut der Bakterien mit ihrer, im lebenden Zustand auf das feinste regulierten Permeabilität ein unvergleichlich subtileres Agens ist, als die unseren Versuchen zugrunde liegende Tierkohle, so dürfen wir doch vielleicht die *Kräfte*, welche bei den beiden Systemen an den Grenzflächen nach außen hin wirksam sind, die Oberflächenkräfte der Adsorption also, für identisch halten. Unter Berücksichtigung dieses Unterschiedes haben wir nun versucht, unsere für die irreversible Adsorption gewonnenen k-Werte mit den Abtötungszeiten der Desinfektionsversuche an Staphylokokken in Beziehung zu setzen. Bezeichnet man mit dk die Größe der Adsorptionskonstante, welche in der Zeit dt den Tod der Bakterie hervorruft, und ist die prozentuale Abnahme $-dk/k$ für ein bestimmtes dt konstant und für ein veränderliches dt diesem proportional, so gilt folgende Differentialgleichung:

$$-dk/k = c.dt,$$

wenn c einen konstanten Proportionalitätsfaktor darstellt. Das unbestimmte Integral obiger Differentialgleichung ergibt

$$-\ln k = ct + \text{konst}$$

für $t = 0$ folgt:

$$\text{konst} = -\ln ko$$

und somit

$$ct = \ln ko/k$$

oder

$$t = 1/c \ln ko/k \qquad 3)$$

ko ist die Konstante der Adsorption zur Abtötungszeit 0, d. h., wenn sofortige Abtötung der Bakterie möglich wäre. Dies hätte zur Voraussetzung, daß die gesamte angewendete Stoffmenge momentan als Anhydrid adsorbiert würde; daher setzten wir *ko* gleich der Konstanten der Gesamtadsorption. Führen wir für *c* den Wert 0,026 ein, so ergeben sich nach obiger Formel für die untersuchten Desinfektionsmittel folgende Abtötungszeiten, welche wir mit den Desinfektionszeiten gegen Staphylokokken aus Tabelle II in Vergleich setzen:

Abtötungszeiten in Minuten:	berechnet	gefunden
Afridol	42′	6′
Oxy-quecksilber-benzoesaures Natrium .	45	20
Oxy-quecksilber-anthranilsaures Natrium	140	180
Oxy-quecksilber-salicylsaures Natrium .	199	240

Es ist natürlich nicht zu erwarten, daß die errechneten Zahlen mit dem Ergebnis der Desinfektionsversuche genau übereinstimmen; denn der subjektive Einfluß des Adsorbens wird sicherlich für die Größe von *k* von erheblicher Wirkung sein; immerhin geht aus einem Vergleich deutlich hervor, daß die Größenordnung und Reihenfolge der Wirksamkeit unserer Präparate in den an Kohle gewonnenen Adsorptionszahlen sich deutlich wiederspiegeln. Auch bestehen befriedigende Beziehungen zu den Untersuchungen von *Madsen* und *Nyman* (8), denn führen wir in ihre Formel

$$t = 1/K . \ln a/a - x$$

für *a* und *a* — *x* die Adsorptionskonstanten *ko* und *k* ein, so erhalten wir die von uns abgeleitete Formel 3). Ebenso lassen sich die Versuche von *Reichenbach* (9), der sich über das Wesen der die Abtötung bedingenden Kräfte nicht geäußert hat, ohne weiteres als Adsorption deuten; denn die von ihm und uns aufgestellten Formeln sind beide „*Exponential-Funktionen*". Die Übereinstimmung beider Formeln geht so weit, daß die *Reichenbach*sche Konstante *k* der monomolekularen Reaktion und die Konstante *C* unserer Formel zufällig fast genau gleich sind. *Reichenbach* findet als Mittelwert von *k* für die Einwirkung von Sublimat auf Milzbrandsporen den Wert 0,0264, während wir in unseren Kohleadsorptionsversuchen 0,026 finden.

Daß bezüglich dieser vier Verbindungen keinerlei Beziehungen zwischen bakterizider Kraft und Giftigkeit im Warmblüterorganismus bestehen, der von einem ganz anderen Wirkungsmechanismus reguliert

wird (10), soll an dieser Stelle besonders hervorgehoben werden; denn ihre Dosis tol. pro Kilogramm Kaninchen ist unter Wahrung der Reihenfolge obiger Tabelle 25, 15, 10, 7 mg. Ihre Giftwirkung ist also der Desinfektionskraft nahezu umgekehrt proportional.

Nach allen bisherigen Erfahrungen war zu erwarten, daß sich Blutkohle zu den vorstehenden Versuchen am besten eignen würde, und so hat es uns nicht überrascht, festzustellen, daß z. B. *Kaolin* gegenüber den verwendeten Präparaten keinerlei adsorptive Eigenschaften zeigte.

4. Theoretisches.

Es ist vielleicht von Interesse, die Frage zu erörtern, wie die obigen Versuchsergebnisse sich in das Bild eingliedern, welches man sich bisher vom Vorgang der Desinfektion gemacht hat.

Was zunächst den Aufbau der Bakterienzellen betrifft, so läßt sich so viel sagen, daß sie im Gegensatz zu den Amöben eine bestimmte Zellform besitzen, die eine Außenschicht von gewisser Festigkeit zur Voraussetzung hat. Dieser Gerüstsubstanz schließt sich das Protoplasma mit seiner Plasmahaut an, welche von dem osmotischen Druck der Zellflüssigkeit gegen die Gerüstsubstanz angepreßt wird. Der Stoffwechsel der Bakterienzelle ist von der Permeabilität dieser beiden Organe abhängig und wird, solange der Lebensprozeß dauert, von ihnen auf das feinste selektiv reguliert, wobei der Plasmahaut wohl der Hauptanteil zufällt.

Durch welche Faktoren die Plasmahaut diese fein abgestufte Permeabilität erreicht, ist trotz vielseitiger, eingehendster Versuche noch nicht befriedigend geklärt. Der *Poren-* bzw. *Ultrafiltertheorie Ruhlands* (11), welche die Plasmahaut als Molekülsieb auffaßt, steht die von *Nernst* (12) und *Overton* (13) entwickelte *Lipoidtheorie* gegenüber, nach welcher speziell Cholesterin, Lecithin und andere Phosphatide an ihrem Aufbau beteiligt sein sollen. Andere Autoren aber wollen die Plasmahaut als reine *Eiweißmembran* aufgefaßt wissen. Die meiste Anerkennung hat die Vereinigung der beiden letzten Anschauungen durch *Nathansohn* (14) erfahren, der sich die Plasmahaut als ein *Mosaik* aus Eiweiß- und Lipoidenbausteinen vorstellt. Diese Anschauung erklärt am zutreffendsten die jedenfalls in groben Zügen geltende Tatsache, daß organische Substanzen so überaus leicht permeieren, während die anorganischen Salze praktisch fast gar nicht einzudringen vermögen. Diesen, sich im Laufe der Zeit immer weiter verfeinernden Anschauungen über den Aufbau der Zellmembran haben sich die Theorien der Desinfektion fortschreitend anpassen müssen.

Drei Wirkungsmechanismen scheinen hier möglich. Wenngleich bei einem Mikroorganismus, dessen Oberfläche aus Lipoid- und Eiweißfeldern besteht, in seiner Wechselwirkung mit chemischen Agenzien die Oberflächenkräfte naturgemäß im Vordergrund stehen, so ist doch nicht von der Hand zu weisen, daß gewisse Körperklassen, die, wie die Aldehyde, bereits im Reagenzglas mit Proteinen zu reagieren vermögen, auch der Bakterie gegenüber im Sinne einer *echten chemischen Reaktion* in Wirkung treten. Es ist das Verdienst von *Herzog* und *Betzel* (15), gezeigt zu haben,

daß in der Tat der Formaldehyd in diesem Sinne wie ein echtes Chemikale mit Bakterien zu reagieren vermag.

Alle die übrigen zahlreichen und ihrem chemischen Aufbau nach noch so verschiedenen Desinfektionsmittel werden sich aber doch in einem Punkte gleichen müssen, nämlich in der Fähigkeit, sich an kolloiden Oberflächen anzureichern. Diese Bedingung erfüllen chemisch recht heterogene Individua, organische Moleküle ebensogut wie Schwermetallionen, indessen mit dem Unterschied, daß sich erstere hauptsächlich wohl an die Lipoidfelder wenden, letztere ihre bekannte Affinität an den Partialvalenzen der Proteine abzusättigen bestrebt sein werden. So entstehen zwei weitere Klassen der Desinfektionswirkung, deren Prototype, wie auch *Putter* (26) neuerdings richtig betont, einerseits im *Phenol* mit seinem von *Reichel* (16) besonders eingehend studierten Wirkungsmechanismus, andererseits im *Sublimat* vorliegen.

Das Problem der Anreicherung an Oberflächen ist noch nicht mit der wünschenswerten Deutlichkeit von der physikalischen Chemie klargelegt. *J. Traube* (17) versucht zwar die Anreicherung an Grenzflächen, die gegenüber einer angrenzenden lipoiden flüssigen Phase als *Verteilung* gegenüber einer festen als *Adsorption* erscheint, aus dem Begriff des *Haftdrucks* zu erklären, indessen ist diese Bezeichnung nicht sonderlich glücklich und läßt jeden Zusammenhang zwischen chemischer Konstitution und physikalisch-chemischen Eigenschaften vermissen. Der eine von uns (18) hat kürzlich versucht, diesem Mangel abzuhelfen durch Einschiebung des Begriffs der *Hydratationszentra*, welcher der Wahrheit schon näher zu kommen scheint, soweit es sich um organische Moleküle handelt. Danach hätten wir uns vorzustellen, daß ein Kohlenwasserstoff dadurch eine immer größere Wasserlöslichkeit erhält, daß wir in sein Molekül solche anorganische Gruppen einfügen, welche im Sinne der kürzlich von *Fajans* (19) entwickelten Anschauungen Wassermoleküle, die nach *Debye* als *Dipole* aufzufassen sind, zu richten und anzulagern vermögen. So wird beispielsweise durch Eintritt der Hydroxylgruppe aus Benzol das Phenol oder aus dem praktisch wasserunlöslichen Propan über den Propylalkohol mit seiner Löslichkeit in Wasser *und* organischen Solvenzien schließlich das Glycerin mit seiner bevorzugten Wasserlöslichkeit. Als solche Hydratationszentra können z. B. außer dem Hydroxyl noch Carboxyl-, Sulfo-, Carbonyl sowie Amidogruppen und ihre Derivate funktionieren.

Diese Hydratationszentra sind es also, welche jenen Faktor regulieren, den die *Traube*sche Theorie *Haftdruck* nennt. Je mehr Hydratationszentra vorhanden sind oder je stärker sie im Sinne der *Fajans*schen Anschauung wirken, desto weniger wird eine gelöste Substanz sich im Sinne der *Gibb*schen Theorie an der Oberfläche anreichern und somit um so weniger bestrebt sein, „an der Grenze zweier Phasen sich in der benachbarten lipoiden zu lösen, in diese hinein zu diosmieren oder sich von einer zweiten etwa festen Phase adsorbieren zu lassen."

Durch diese Anschauung wird es leicht verständlich, daß ein so stark als Hydratationszentrum wirkender Substituent wie die Sulfogruppe die Desinfektionskraft der Phenole, Naphthole usw. praktisch nahezu aufheben kann und daß die Einfügung selbst eines Carboxyls wie etwa bei der Salicylsäure sie herabsetzt, wo hingegen Alkylgruppen und Halogene sie zu erhöhen vermögen. Wir können also jene große zweite Klasse von Desinfizientien zusammenfassen als die Gruppe der *lipoiden* Desinfektionsmittel und sie definieren als reagierend nach Art der Narkotika, welche, dem *Henry*schen

Verteilungsgesetz folgend, durch geeignete aktive Gruppen in der Zelle dann irreversible Schädigungen zu setzen vermögen.

Die dritte Gruppe der Desinfizientien hat ihren Angriffspunkt hauptsächlich in den *Eiweißflächen*. Es ist das Verdienst von *Bechold* (20), die Wichtigkeit der *Adsorption* für die Deutung der Desinfektion als erster klar erkannt zu haben, und *Morawitz* (21) konnte fast gleichzeitig diese Vorstellungen experimentell stützen. Auf Grund von Adsorptionsversuchen mit Sublimat an Tierkohle stellte er eine Hypothese über die Wirkung von Protoplasmagiften auf und zeigte, daß sich die Desinfektionsversuche von *Paul* und *Krönig* nach einer Adsorptionsgleichung errechnen lassen. Diesen *Morawitz*schen Versuchen schließen sich die unseren auf das beste an, doch lehren sie, daß es bei der Desinfektion durch Schwermetalle weniger auf Ionen als vielmehr auf die Fähigkeit zur Adsorption ankommt. Dies ist zwar, solange es sich um reine Salze handelt, praktisch identisch, bei Verbindungen feineren Aufbaues wie die von uns geprüften organischen Quecksilberverbindungen lagert sich aber der Einfluß der Hydratationszentra über die primäre Ionenwirkung. Diese aber machen es verständlich, daß die Alkyl- oder Oxalkylderivate im Sinne der Tabelle II wesentlich besser desinfizieren als solche mit Amido-, Phenol- oder gar Sulfogruppen neben dem Carboxyl.

Es soll gern zugegeben werden, daß wir mit den hier entwickelten Anschauungen der Hydratationszentra uns erst in einem Anfangsstadium befinden und zunächst nicht gleich alle Tatsachen erklären können, z. B. die bei fortschreitender Bromsubstitution der Naphthole auftretenden „*Maxima*" der *Bechold*schen halbspezifischen Desinfektionsmittel (22), oder das gleichsinnige Verhalten zu hoch alkylierter Kupreinderivate in den schönen Untersuchungen *Morgenroths*, doch scheint es aussichtsreich, in der vorgezeichneten Richtung auch für diese Erscheinungen Aufklärung zu suchen.

Über den feineren Wirkungsmechanismus solcher an die Eiweißflächen adsorbierter Systeme sind die Ansichten noch geteilt. *Süpfle* und *Müller* (23) konnten in ihren schönen Arbeiten in Anlehnung an ältere Untersuchungen von *Ottolenghi* (24) zeigen, daß die Adsorption des Sublimats noch keinen bakteriziden Effekt zu bedingen braucht, da Milzbrandsporen selbst nach 40tägigem Aufenthalt in 2 proz. Sublimatlösung durch Nachbehandlung mit Tierkohle auf geeigneten Nährböden zur Entwicklung gebracht werden konnten. Diese erstaunliche Tatsache wird aber im Sinne der obigen Anschauung doch verständlich, wenn wir annehmen müssen, daß die Quecksilberionen ihren Angriffspunkt vornehmlich in der Gitterstruktur der Eiweißflächen haben und sich dort in einer reversibel adsorptiven Bindung befinden, welche von einer chemisch koordinativen Bindung komplexer Salze, etwa der an dreiwertig negativen Stickstoff, wohl kaum zu unterscheiden ist. Sie ist stabil genug, um eine Wanderung in das Zellinnere zu verhindern.

Bei der von uns untersuchten Körperklasse werden die Bedingungen eines Eindringens auf Grund der überaus großen Schwerlöslichkeit der Anhydridanteile noch viel geringer sein, andererseits aber ist es noch weit unwahrscheinlicher, daß diese adsorptive Bindung wieder reversibel wird. Dadurch erklären sich auch wohl die großen praktischen Erfolge, welche die organischen Quecksilberverbindungen, z. B. die Saatgutbeize *Uspulun* (10), bei der Abtötung pathogener Keime auf den Oberflächen jeglichen Saatgutes aufzuweisen haben. So muß es also doch wohl — trotz der von

kompetenter Seite geäußerten Bedenken [*Süpfle*, *Höber* (25)] — möglich sein, rein von außen her, wie *Putter* (26) sehr richtig sagt, durch „*Barrièrewirkung*" nicht nur den Zellteilungsmechanismus, sondern schließlich den gesamten Stoffwechsel der Zelle zum Erliegen zu bringen.

Auch im Hinblick auf ein anderes großes Problem ist es notwendig, die Frage der adsorptiven Desinfektion in ihre letzten Feinheiten zu verfolgen; denn wenn man die Dosen der hierzu geeigneten Substanzen nur klein genug wählt, kann sich ja im Sinne der *Arndt-Schulz*schen Regel die Wirkung in ihr Gegenteil umkehren und der durch jene Substanzen gesetzte Reiz bewirkt die *Wachstumssteigerung*, aus der z. B. unsere Landwirtschaft im Uspulun heute einen erfreulichen Nutzen zieht. Beide Probleme — Desinfektion und Wachstumssteigerung — sind somit nur verschiedene Etappen ein und desselben Vorganges, und die Klarlegung des einen wird bei dem Versuch, das Wesen des anderen zu ergründen, von Nutzen sein. In beiden Richtungen soll die vorliegende Arbeit fortgesetzt werden.

Literatur.

1) *Paul* und *Krönig*, Zeitschr. f. physik. Chem. **21**, 414—450, 1896; Zeitschr. f. Hyg. u. Inf. **25**, 1, 1897. — 2) *Schrauth* und *Schoeller*, Zeitschr. f. Hyg. u. Inf. **66**, 497, 1910. — 3) *Schoeller* und *Schrauth*, ebendaselbst **67**, 24, 1911. — 4) *P. Karrer*, Schweiz. Chemikerztg. **40**, 486, 1920. — 5) *Otto Warburg*, Zeitschr. f. Elektrochem. 1922, S. 70. — 6) *H. Freundlich*, Zeitschr. f. physik. Chem. **57**, 392, 1907. — 7) *L. Michaelis*, „Die Wasserstoffionenkonzentration" 2. Aufl., S. 209. — 8) *Madsen* und *Nyman*, Zeitschr. f. Hyg. u. Inf. **57**, 388, 1907. — 9) *H. Reichenbach*, ebendaselbst **69**, 171, 1911. — 10) *W. Schoeller*, Die biochemische Bedeutung der organischen Quecksilberverbindungen. „Die Naturwissenschaften" **10**, 1073—1074, 1922. — 11) *Ruhland*, Ber. d. deutsch. bot. Ges. **30**, 139, 1912; **31**, 553, 1913. — 12) *W. Nernst*, Zeitschr. f. physik. Chem. **6**, 37, 1890. — 13) *Overton*, Vierteljahrschr. d. Naturf. Ges. Zürich **40**, 1, 1895; **44**, 88, 1899. — 14) *Nathansohn*, Jahrb. f. wiss. Bot. **39**, 607, 1904. — 15) *Herzog* und *Betzel*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **67**, 309, 1910. — 16) *H. Reichel*, diese Zeitschr. **22**, 149—231, 1909. — 17) *J. Traube*, ebendaselbst **98**, 179, 1919; Zeitschr. f. Immunitätsf. u. exper. Ther. **29**, 286, 1920; *Traube* und *Somogyi*, diese Zeitschr. **120**, 90, 1921. — 18) *W. Schoeller*, Zeitschr. f. angew. Chem. **36**, 238, 1923. — 19) *K. Fajans*, vgl. Sammelreferat Naturwissensch. **11**, 169, 1923. — 20) *H. Bechold*, Zeitschr. f. koll. Chem. **5**, 22, 1909. — 21) *Morawitz*, Kolloidchem. Beih. **1**, 301, 1910. — 22) *Bechold*, Zeitschr. f. Hyg. **64**, 113, 1909; **84**, 1917. — 23) *Süpfle* und *Müller*, Arch. f. Hyg. **89**, 351, 1920; *A. Müller*, Zeitschr. f. Hyg. u. Inf. **99**, 94—97, 1923. — 24) *Ottolenghi*, Desinfektion **2**, 109. — 25) *R. Höber*, Physik. Chem. d. Zelle u. d. Gewebe, 4. Aufl., S. 230. — 26) *E. Putter*, Klin. Wochenschr. **2**, 890, 1923.

Untersuchungen zur Lehre von der Blutgerinnung.

VIII. Mitteilung.

Über die Gerinnungshemmung durch Neutralsalze.

Von

Bernhard Stuber und **Minoru Sano** (Japan).

(Aus dem Laboratorium der medizinischen Klinik zu Freiburg in Br.)

(Eingegangen am 4. Juni 1923.)

Mit 18 Tabellen im Text.

In unserer letzten Arbeit[1]) hatten wir den experimentellen Versuch unternommen, den Verlust des Gerinnungsvermögens des Oxalat- und Citratblutes, entgegen der üblichen Anschauung, auf die Bildung der entsprechenden komplexen Fribinogen-Salzverbindungen zurückzuführen. Die leichte Ionisierbarkeit dieser Verbindungen verhindert deren Gerinnung. Jeder Eingriff, der, nach allgemein physikalisch-chemischen Gesetzen, die Ionisation dieser Komplexverbindungen zurückdrängt, wie Verdünnung oder Salzüberschuß, oberflächenaktive Stoffe usw., kann die Gerinnungsfähigkeit wiederherstellen. Die alleinige Bedeutung der kalkfällenden Eigenschaften der Oxalate und Citrate für die Aufhebung der Gerinnung glaubten wir auf Grund unserer experimentell gestützten Vorstellungen ablehnen zu müssen.

Wir haben nun, von diesen kolloidchemischen Anschauungen ausgehend, unsere Versuche auf die übrigen gerinnungshemmenden Salze ausgedehnt. Über die Ergebnisse dieser Versuche zu berichten, soll der Gegenstand dieser Arbeit sein. Zur Prüfung gelangten die Gallensalze, das Magnesiumsulfat, das Natriumchlorid und Natriumfluorid.

Eine sichere Erklärung für die Wirkungsweise dieser Salze gibt es nicht. Nach der herrschenden Fermenttheorie enthält zwar das Kochsalzplasma alle zur Gerinnung nötigen Faktoren, es soll aber dieselben hindern, miteinander in Verbindung zu treten. Daß damit keine Erklärung des Vorgangs gegeben ist, leuchtet ohne weiteres ein. Auch für das Magnesiumsulfat und Gallensalzplasma wurden ähnliche

---

[1]) Diese Zeitschr. **134**, 1922.

Vorstellungen herangezogen, indem man, je nach der Konzentration der Salze, an eine Hemmung der Thrombinentstehung aus seiner Vorstufe oder an eine Wirkung auf das schon gebildete Thrombin dachte. Die Aufhebung der Gerinnung durch Natriumfluorid ließ als Ursache, ähnlich dem Oxalat- und Citratblut, wiederum die Ausfällung des Kalkes erscheinen. Jedoch wurden hier schon früh Zweifel laut, da es auch bei Zufuhr von Kalk vielfach nicht mehr gelingt, ein solches Plasma zum Gerinnen zu bringen. *Arthus* dachte deshalb schon an eine toxische Wirkung des Natriumfluorids auf die Blutkörperchen selbst, wodurch der Austritt von Thrombokinase verhindert werden sollte. Wir sehen also, daß der Wirkungsmechanismus dieser gerinnungshemmenden Salze noch durchaus unklar ist, wieder ein Beweis dafür, wie wenig die herrschende Fermentlehre in der Lage ist, das Gerinnungsproblem in seinen Einzelheiten klarzulegen.

Wir gehen nun zur Schilderung unserer eigenen Untersuchungen über und beginnen mit den Versuchen, welche die gerinnungshemmende Wirkung der gallensauren Salze ergründen sollten. Wir benutzten das Natrium cholalicum, glykocholicum, taurocholicum und das Natriumsalz der *Wieland*schen Desoxycholsäure. Zunächst suchten wir, um möglichst einfache Versuchsbedingungen zu haben, festzustellen, in welcher Weise die Fibrinogen-Thrombingerinnung durch diese Salze beeinflußt wird. Das Thrombin wurde, wie in unseren früheren Arbeiten nach der Methode von *Alex Schmidt*, das Fibrinogen nach *Hammarsten* dargestellt. Die Beobachtungsdauer der Versuche erstreckte sich meist auf 48 Stunden.

Tabelle I.

Thrombinmenge Tropfen	Fibrinogen Menge ccm	Fibrinogen Zusatz	Gerinnungszeit
15	1	—	25 Minuten
15	1	Natr. cholalic. 2%	nach 12 Stunden
15	1	„ „ 2 „	nach 12 Stunden
15	1	„ taurocholic. 2%	nach 12 Stunden
15	1	„ „ 2 „	nach 12 Stunden
15	1	„ glykocholic. 2 „	nicht geronnen
15	1	„ „ 2 „	nicht geronnen

Sämtliche geprüften Gallensäuren verzögern die Fibrinogen-Thrombingerinnung bzw. heben dieselbe ganz auf (Tabelle I und II). Die stärkste Wirkung zeigen die Salze der Glyko- und Taurocholsäure. Dabei spielt das gegenseitige Mengenverhältnis zwischen Eiweiß- und Gallensäure eine ausschlaggebende Rolle. Bei optimalen beiderseitigen quantitativen Verhältnissen bleibt die Gerinnung vollständig aus. Am deutlichsten zeigt sich dies in den Versuchen mit Natrium-

Tabelle II.

Fibrinogen Eiweißgehalt ‰	Fibrinogen Gehalt an Zusätzen	Fibrinogen Menge ccm	Thrombinmenge Tropfen	Gerinnungszeit
7,6	4 % Natr. cholalic.	1	15	24 Stunden
7,6	3 „ „ „	1	15	7 „
7,6	2 „ „ „	1	15	7 „
7,6	1 „ „ „	1	15	2 „
7,6	0,5 „ „ „	1	15	2 „
2,53	4 „ „ „	1	15	24 „
2,53	3 „ „ „	1	15	24 „
2,53	2 „ „ „	1	15	2 „
2,53	1 „ „ „	1	15	2 „
2,53	0,5 „ „ „	1	15	2 „
7,6	Kontrollen —	1	15	25 Minuten
2,53	„ —	1	15	25 „
7,6	4 % Natr. taurochol.	1	15	24 Stunden
7,6	3 „ „ „	1	15	24 „
7,6	2 „ „ „	1	15	2 „
7,6	1 „ „ „	1	15	2 „
7,6	0,5 „ „ „	1	15	2 „
2,53	4 „ „ „	1	15	nicht geronnen
2,53	3 „ „ „	1	15	„ „
2,53	2 „ „ „	1	15	„ „
2,53	1 „ „ „	1	15	2 Stunden
2,53	0,5 „ „ „	1	15	2 „
7,6	4 % Natr. glykochol.	1	15	nicht geronnen
7,6	3 „ „ „	1	15	„ „
7,6	2 „ „ „	1	15	24 Stunden
7,6	1 „ „ „	1	15	2 „
7,6	0,5 „ „ „	1	15	2 „
2,53	4 „ „ „	1	15	nicht geronnen
2,53	3 „ „ „	1	15	„ „
2,53	2 „ „ „	1	15	„ „
2,53	1 „ „ „	1	15	2 Stunden
2,53	0,5 „ „ „	1	15	2 „
7,6	2 % Natr. desoxychol.	1	0	gerinnt spontan ohne Thrombin
7,6	1 „ „ „	1	0	„ „
7,6	0,5 „ „ „	1	0	„ „
7,6	0,3 „ „ „	1	15	80 Minuten
7,6	0,1 „ „ „	1	15	50 „
2,53	2 „ „ „	1	15	nicht geronnen
2,53	1 „ „ „	1	15	„ „
2,53	0,5 „ „ „	1	15	24 Stunden
2,53	0,3 „ „ „	1	15	80 Minuten
2,53	0,1 „ „ „	1	15	50 „

desoxycholat. Zweifellos spielt dabei die Neigung der Gallensäuren zu Additionsverbindungen in molekularen Verhältnissen die ausschlaggebende Rolle. Gerade letztere Eigenschaft ist ja nach den bekannten Untersuchungen von *Heinrich Wieland* und seinen Mitarbeitern[1]) bei

[1]) *Heinrich Wieland* und Mitarbeiter, Zeitschr. f. physiol. Chem. **80**, **97**, **98**, **106**, **110**.

der Desoxycholsäure besonders ausgeprägt. Darauf dürfte auch die in unseren Versuchen beobachtete Gerinnung des Fibrinogens durch alleinigen Zusatz von desoxycholsaurem Natrium in höheren Konzentrationen beruhen (Tabelle II). Die Verbindung des Desoxycholats mit Serumeiweißkörpern ist ja schon durch die Untersuchungen von *Hermann Wieland*[1]) sehr wahrscheinlich gemacht worden.

Unsere Versuche hatten uns so in dem Verdacht bestärkt, daß auch die Wirkung der Gallensäuren bezüglich der Gerinnungshemmung durch die Bildung eines ionisierten Gallensäuren-Fibrinogens bedingt sei. Zur weiteren Erhärtung dieser Anschauung prüften wir nun, wie in unseren früheren Versuchen, die Alkoholfällbarkeit und die Reibung von Fibrinogenlösungen nach Gallensäurenzusatz in wechselnden Konzentrationen. Alles Nähere ist aus den Protokollen zu entnehmen. Die Reibungsversuche wurden mit dem *Traube*schen Viskostagonometer bei 18° durchgeführt. Für die Alkoholfällungsversuche wurde eine Fibrinogenlösung von 7,5‰ Eiweiß und 3,5% Kochsalzgehalt benutzt. Diese Fibrinogenlösung (Stammlösung) wurde in vier verschiedenen Verdünnungen angewandt, und zwar:

1. Fibrinogenstammlösung 1 Teil + 19 Teile physiologische NaCl-Lösung.
2. Fibrinogenstammlösung 2 Teile + 18 Teile physiologische NaCl-Lösung.
3. Fibrinogenstammlösung 3 Teile + 17 Teile physiologische NaCl-Lösung.
4. Fibrinogenstammlösung 4 Teile + 16 Teile physiologische NaCl-Lösung.

Für die folgenden Versuche in Tabelle IV wurde eine Fibrinogenstammlösung von 2‰ Eiweiß- und 1,8% NaCl-Gehalt benutzt. Die Verdünnungen wurden in derselben Weise wie in den vorhergehenden Versuchen vorgenommen.

Die Versuche der Tabellen III und IV ergeben also, daß Fibrinogenlösungen, mit gallensauren Salzen versetzt, von einem bestimmten Gehalt ab durch *Alkohol nicht mehr koagulierbar* sind. Ebenso wird die *Hitzekoagulation* aufgehoben. Die wirksame Konzentration an Gallensalzen beginnt durchschnittlich bei n/400. Mit dem Verlust der Alkohol- und Hitzefällbarkeit zeigt sich auch ein starker Anstieg der inneren Reibung, wie aus den Kurven der Tabellen V und VII entnommen werden kann.

In diesen Kurven finden sich die Werte der relativen Reibung in der Ordinate, die Konzentration der gallensauren Salze in der

[1]) *Hermann Wieland* und Mitarbeiter, Arch. f. exper. Pathol. u. Pharm. 85, 86.

Tabelle III.

Fibrinogenlösung[1])	Menge ccm	Zusatz	Menge ccm	Alkohol 95 proz. ccm	Fällung[2])
1 2 3 4	1	n/10 Natr. cholalic.	1	0,5	— — — —
1 2 3 4	1	n/800 „ „	1	0,5	— — — —
1 2 3 4	1	n/600 „ „	1	0,5	— — + +
1 2 3 4	1	n/400 „ „	1	0,5	± + ++ ++
1 2 3 4	1	n/100 „ „	1	0,5	± + ++ +++
1 2 3 4	1	n/10 Natr. glykocholic.	1	0,5	± ± ± ±
1 2 3 4	1	n/800 „ „	1	0,5	± ± ± ±
1 2 3 4	1	n/600 „ „	1	0,5	± ± + +
1 2 3 4	1	n/400 „ „	1	0,5	± + ++ ++
1 2 3 4	1	n/100 „ „	1	0,5	+ ++ ++ +++
1 2 3 4	1	Kontrollen mit physiologischer NaCl-Lösung	1	0,5	+ ++ ++ +++
1 2 3 4	1	Kontrollen mit H_2O	1	0,5	+ ++ +++ +++

1) Die Zahlen beziehen sich auf die vorstehend angegebene Verdünnung.
2) + -Zeichen = Stärke der Fällung, — -Zeichen = keine Fällung.

Tabelle IV.

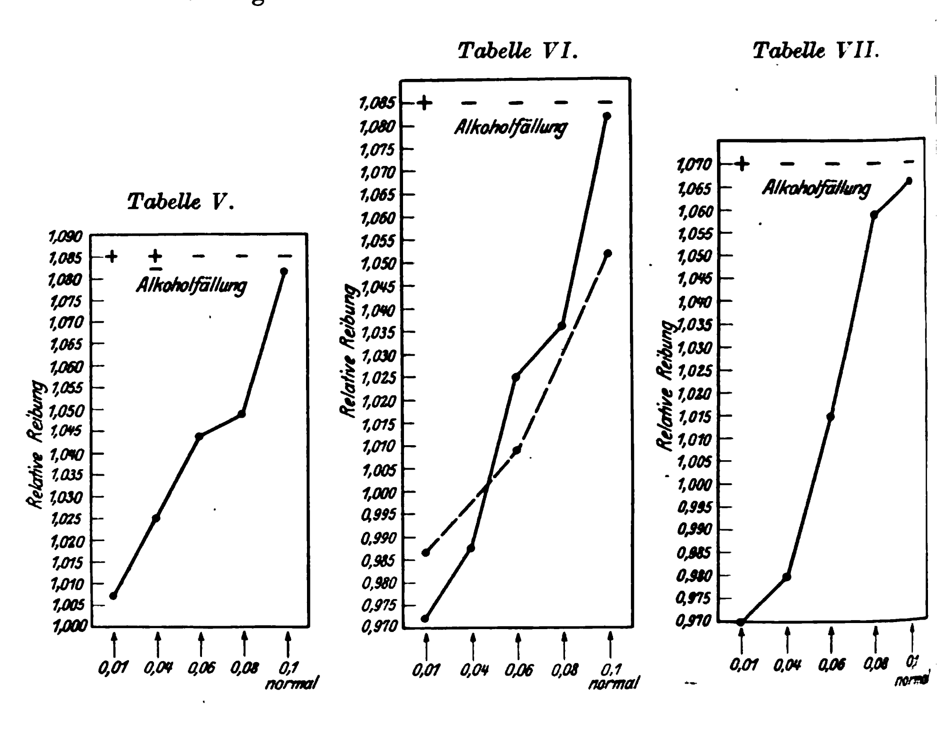
Fibrinogenlösung[1])	Menge ccm	Zusatz	Menge ccm	Alkohol 95 proz. ccm	Fällung
1	1	n/10 Natr. cholalic.	1	0,5	—
2					—
3					—
4					—
1	1	n/800 „ „	1	0,5	—
2					—
3					—
4					—
1	1	n/600 „ „	1	0,5	—
2					—
3					+
4					+
1	1	n/400 „ „	1	0,5	±
2					+
3					++
4					++
1	1	n/100 „ „	1	0,5	+
2					++
3					++
4					+++
1	1	n/10 Natr. glykocholic.	1	0,5	—
2					—
3					—
4					—
1	1	n/800 „ „	1	0,5	—
2					—
3					—
4					—
1	1	n/600 „ „	1	0,5	—
2					—
3					—
4					—
1	1	n/400 „ „	1	0,5	—
2					±
3					+
4					+
1	1	n/100 „ „	1	0,5	+
2					++
3					++
4					++
1	1	n/10 Natr. taurocholic.	1	0,5	—
2					—
3					—
4					—
1	1	n/800 „ „	1	0,5	—
2					—
3					—
4					—

[1]) Die Zahlen bedeuten die Verdünnung wie vorstehend.

Tabelle IV (Fortsetzung).

Fibrinogen-lösung	Menge ccm	Zusatz	Menge ccm	Alkohol 95 proz. ccm	Fällung
1	1	n/600 Natr. taurocholic.	1	0,5	—
2					—
3					—
4					—
1	1	n/400 „ „	1	0,5	—
2					+
3					+
4					++
1	1	n/100 „ „	1	0,5	±
2					+
3					+
4					++
1	1	Kontrollen mit physiologischer NaCl-Lösung	1	0,5	+
2					++
3					++
4					+++

Abszisse eingezeichnet. Die an den Kopfenden der Kurven angebrachten +- bzw. —-Zeichen orientieren über die vorhandene bzw. fehlende Alkoholflockung.



Diese Befunde in ihrer Gesamtheit sind unseres Erachtens nur so zu deuten, daß die *gallensauren Salze mit dem Fibrinogen eine komplexe weitgehend ionisierte Verbindung eingehen, wodurch die Gerinnungsfähigkeit des Fibrinogens aufgehoben wird.*

Die weiteren Versuche beschäftigen sich nun mit der gerinnungshemmenden Wirkung des Magnesiumsulfats, Natriumchlorids und Natriumfluorids. Der Fibrinogenlösung wurden die Salze in der zur Verhinderung der Gerinnung des Blutes üblichen Menge zugesetzt, und zwar eine 28proz. Magnesiumsulfatlösung im Verhältnis 3:1, eine 20proz. Natriumchloridlösung im Verhältnis 3:1, eine 2proz. Natriumfluoridlösung im Verhältnis 9:1. Die Fällungsversuche wurden mit verschiedenen Konzentrationen von Alkohol ausgeführt, da die betreffenden Salze in hohen Alkoholkonzentrationen zum Teil ausflocken.

Die Ergebnisse der Tabelle VIII zeigen beim Magnesiumsulfat- und Natriumchloridfibrinogen eine ausgesprochene Abschwächung

Tabelle VIII.

Fibrinogen	Zusatz	Alkohol 0,5 ccm						
		100 proz.	90 proz.	80 proz.	70 proz.	60 proz.	50 proz.	40 proz.
1 ccm	$MgSO_4$ 28%	+++	++	+	—	—	—	—
„	NaCl 20%	+++	++	+	—	—	—	—
„	NaF 2%	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++
„	Kontrolle	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++

bzw. Aufhebung der Alkoholfällung, die, wie aus den Kurven der Tabellen IX und X hervorgeht, mit dem Reibungsanstieg parallel gehen. Die gerinnungshemmende Wirkung des Magnesiumsulfats und Natriumchlorids dürfte also durch *dieselben* Faktoren bedingt sein wie bei den Gallensalzen. Auch hier verhindert die Bildung *ionisierter Komplexverbindungen* die Gerinnung.

Tabelle IX.

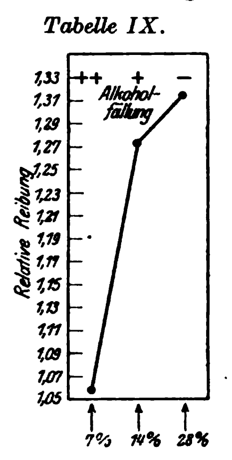
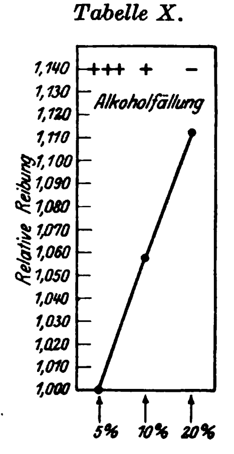


Tabelle X.





Auf ganz anderen Ursachen scheint jedoch die gerinnungshemmende Wirkung des Natriumfluorids zu beruhen. Die Alkoholfällbarkeit des Fibrinogens wird durch Natriumfluorid in keiner Weise beeinflußt (Tabelle VIII). Damit war die Vermutung gegeben, daß der Angriffspunkt desselben, nicht wie bei den bisher besprochenen Salzen, das Fibrinogen bzw. die Bluteiweißkörper sind, sondern die korpuskulären Elemente des Blutes, wie dies schon *Arthus* als eine Komponente der Natriumfluoridwirkung vermutet hatte. Die folgenden Versuche beschäftigen sich nun näher mit dieser Frage.

Tabelle XI.

Fibrinogen 9,5 °/oo Eiweiß 1.7 °/o NaCl ccm	Zusatz	Thrombin	Gerinnung	Koagulation durch Alkohol	Koagulation durch Hitze
0,9	0,1 ccm NaF 2%	Serum 15 Tropfen	+		
0,9	0,1 „ NaF 2 „	„ 15 „	+		
0,9	0,1 „ NaF 2 „	Thrombin 15 „	+		
0,9	0,1 „ NaF 2 „	„ 15 „	+		
0,9	0,1 „	„ 15 „	+		
0,9	0,1 „ physiol.	„ 15 „	+		
0,9	0,1 „ NaCl	—		+	
0,9	0,1 „	—			+
0,9	0,1 „ NaF 2%	—		+	
0,9	0,1 „ NaF 2 „	—			+
Fibrinogen verdünnt 2:1 mit physiol. NaCl					
0,9	0,1 „ NaF 2 „	Serum 15 Tropfen	+		
0,9	0,1 „ NaF 2 „	Thrombin 15 „	+		
0,9	0,1 „ NaF 2 „	„ 15 „	+		
0,9	0,1 „ NaF 2 „	—		+	
0,9	0,1 „ physiol.	Thrombin 15 Tropfen	+		
0,9	0,1 „ NaCl	„ 15 „	+		
0,9	0,1 „ NaF 2%	—		+	
0,9	0,1 „ NaF 2 „	—			+

Zunächst wurde der Einfluß des Natriumfluorids auf die durch Serum bzw. Thrombinzusatz bewirkte Fibrinogengerinnung festgestellt. Dabei wurden der Eiweiß- und Kochsalzgehalt, desgleichen die Fluoridkonzentration, weitgehend variiert. Ebenso wurde die Koagulation durch Hitze und Alkohol geprüft.

Irgend eine hemmende Wirkung des Natriumfluorids auf die Thrombin-Fibrinogengerinnung konnte also nicht gefunden werden (Tabelle XI). Vielfach verlief sogar die Gerinnung bei Fluoridzusatz rascher.

Auch bei stärkerer Natriumfluoridkonzentration war das Ergebnis dasselbe, wie aus Tabelle XII zu entnehmen ist.

Zur weiteren Klärung dieser Frage wurden die folgenden Versuche am Gesamtblut ausgeführt. Das Blut wurde teilweise vom Menschen,

Tabelle XII.

Fibrinogen ccm	NaF	Zusatz	Gerinnung
1	Gesättigte NaF-Lösung 0,5 ccm	Thrombin 15 Tropfen	+
1	Gesättigte NaF-Lösung 2 Teile Wasser 1 Teil 0,5 ccm	„ 15 „	+
1	Gesättigte NaF-Lösung 1 Teil Wasser 1 Teil 0,5 ccm	„ 15 „	+
1	Gesättigte NaF-Lösung 1 Teil Wasser 2 Teile 0,5 ccm	„ 15 „	+
1	Physiol. NaCl 0,5 ccm	„ 15 „	+

teilweise vom Kaninchen entnommen. Es wurde mit großer Sorgfalt auf weitgehendste Schonung der korpuskulären Elemente geachtet. Sämtliche Gegenstände wurden paraffiniert, das Eindringen von Staub durch Stanniolüberdeckung der Gefäße verhindert. Die einzelnen Blutbestandteile wurden getrennt auf die Fibrinogengerinnung untersucht. Die Blutkörperchen teils ungewaschen, teils mit physiologischer NaCl-Lösung oder isotonischer Rohrzuckerlösung, völlig von den Salzzusätzen befreit, in die Versuche eingestellt. Beim Natriumfluorid- bzw. Oxalatplasma wurde das Salz durch Zufügen der berechneten Menge von Calciumchlorid zur Ausfällung gebracht, das entstandene Kalksalz abzentrifugiert, oder wenn Gerinnung eintrat, das Serum abgepreßt. Das Magnesiumsulfat- und Natriumchloridplasma wurden durch Dialyse zum Gerinnen gebracht, das Serum dann ebenfalls abgepreßt. Die zur Verhinderung der Blutgerinnung zugefügten Salzmengen waren die üblichen, und zwar beim Magnesiumsulfat 28% und Natriumchlorid 20% je 1 Teil auf 3 Teile Blut, beim Natriumfluorid 2%, Natriumoxalat 2% und Natriumcitrat 4% je 1 Teil auf 9 Teile Blut. Alle weiteren Einzelheiten sind aus den folgenden Tabellen zu entnehmen.

Die Versuchsergebnisse der Tabellen XIII und XIV können dahin zusammengefaßt werden, daß das Oxalat-Citrat-Magnesiumsulfat und Natriumchloridplasma Fibrinogen nicht zur Gerinnung bringen. Das war nach unseren seither entwickelten Vorstellungen über den Wirkungsmechanismus dieser Salze auch gar nicht anders zu erwarten. Wohl aber ruft das aus diesen Plasmata durch Entfernung dieser gerinnungshemmenden Substanzen gewonnene Serum in Fibrinogenlösungen Gerinnung hervor. Unwirksam sind wieder die entsprechenden gewaschenen Blutkörperchen. Dabei dürften die in den korpuskulären Elementen des Blutes enthaltenen gerinnungsbeschleunigenden Substanzen an ihrem Eintritt in das Plasma durch die erwähnten Salze

nicht gehindert, vielleicht sogar derselbe eher begünstigt werden. Sie allein vermögen aber nicht die Ionisation der komplexen Fibrinogensalzverbindungen zurückzudrängen. So erklären wir uns den negativen Gerinnungsversuch mit Plasma und Blutkörperchen und dessen positives Ergebnis mit dem Serum, das diese Substanzen enthalten muß. *Ganz anders ist die Wirkung des Natriumfluorids.* Eine Bildung einer ionisierten Fibrinogensalzverbindung kommt hier nicht in Frage. Das glauben wir durch unsere Alkoholfällungsversuche (Tabelle VIII) und durch Nachweis der fehlenden Beeinflussung der Fibrinogen-Thrombingerinnung (Tabelle XI und XII) bewiesen zu haben. Die Ergebnisse dieser Versuche sind nur verständlich, wenn man eine Wirkung des Natriumfluorids auf das Fibrinogen, im Sinne der bei den anderen Salzen näher beschriebenen Komplexsalzbildung, *ablehnt.* Diese Vorstellung erhält eine weitere Stütze durch die Versuche der Tabellen XIII und XIV, die zeigen, daß von den Bestandteilen des Natriumfluoridblutes *nur die Blutkörperchen* die Fibrinogengerinnung hervorrufen. Wir sehen also, *daß von den Bestandteilen des Oxalat-Citrat-Magnesiumsulfat- und Natriumchloridblutes nur das Serum, von denen des Natriumfluoridblutes nur die Blutkörperchen die Gerinnung* des Fibrinogens bewirken. Es müssen dementsprechend die gerinnungsbeschleunigenden Stoffe der korpuskulären Elemente des Blutes bei den zuerst erwähnten Salzen in die Blutflüssigkeit übertreten und nach Entfernung der gerinnungshemmenden Salze im Serum zur Wirkung kommen. Man wird deshalb bei ihrem völligen Austritt aus den Körperchen mit diesen auch keine Gerinnung erzielen. Wobei allerdings die Einschränkung gemacht werden muß, daß vielleicht durch die Waschung der Körperchen mit Kochsalzlösung zurückbleibende Mengen derselben entfernt werden könnten. Es ist uns zwar nie gelungen, mit dem Waschwasser eine Wirkung in Fibrinogenlösungen hervorzurufen. Aber selbst wenn auch durch nicht völligen Austritt dieser Substanzen aus den Blutkörperchen mit letzteren eine Gerinnung in Fibrinogenlösung bewirkt werden könnte, so würde dadurch unsere Anschauung vom Wirkungsmechanismus dieser Salze keineswegs beeinflußt. Im Gegensatz dazu steht nun das Ergebnis mit den Blutbestandteilen des Natriumfluoridblutes. Hier sehen wir die *alleinige Wirkung der Blutkörperchen* auf die Fibrinogenlösung. Dadurch scheint uns bewiesen, daß das *Natriumfluorid den Austritt der gerinnungsbeschleunigenden Substanzen aus den korpuskulären Elementen des Blutes verhindert.* Auf diese Weise bringen wohl die vom Salz frei gewaschenen Blutkörperchen, nicht aber das vom Fluorid durch Kalkausfällung befreite Plasma das Fibrinogen zur Gerinnung.

Bemerkenswert erscheint uns auch noch der in folgender Tabelle wiedergegebene Versuch (Tabelle XV). Mit Calciumchlorid ausgefälltes

Tabelle XIII.
Blut vom Menschen.

Fibrinogen ccm	Plasma	Gerinnung	Serum	Gerinnung
		—	NaF-Plasma mit $CaCl_2$ ausgefällt	
	NaF-Plasma			
1	5 Tropfen		5 Tropfen	—
1	10 „	—	10 „	—
1	15 „	—	15 „	—
1	20 „	—	20 „	—
	Natriumoxalatplasma		Serum nach Ausfällen des Oxalatplasmas mit $CaCl_2$	
1	5 Tropfen	—	5 Tropfen	+
1	10 „	—	10 „	+
1	15 „	—	15 „	+
1	20 „	—	20 „	+
	Natriumcitratplasma		Serum nach Ausfällen des Citratplasmas mit $CaCl_2$	
1	5 Tropfen	—	5 Tropfen	+
1	10 „	—	10 „	+
1	15 „	—	15 „	+
1	20 „	—	20 „	+
	$MgSO_4$-Plasma		Serum nach Dialyse des $MgSO_4$-Plasmas	
1	5 Tropfen	—	5 Tropfen	+
1	10 „	—	10 „	+
1	15 „	—	15 „	+
1	20 „	—	20 „	+
	NaCl-Plasma		Serum nach Dialyse des NaCl-Plasmas	
1	5 Tropfen	—	5 Tropfen	+
1	10 „	—	10 „	+
1	15 „	—	15 „	+
1	20 „	—	20 „	+

Natriumfluoridplasma ist, wie nicht anders zu erwarten war, auf Fibrinogen ohne jeden Einfluß. Stellt man aber aus diesem wirkungslosen Plasma Thrombin nach der Methode von *Alexander Schmidt* dar, so bringt dieses Thrombin das Fibrinogen rasch zur Gerinnung. Das ist eine weitere Bestätigung unserer früher geäußerten Ansicht, daß das *Alexander Schmidt*sche Thrombin ein Kunstprodukt darstellt, das keinerlei Schlüsse auf seine biologische Bedeutung rechtfertigt. Und es wird dadurch weiterhin wahrscheinlich gemacht, daß sogenannte Thrombin- und Serumwirkung zweierlei Dinge sind. Näher möchten wir jedoch heute darauf nicht eingehen, das soll in einer späteren Arbeit geschehen.

Bei den Versuchen mit Natriumfluorid muß vor allem darauf geachtet werden, daß keine *mechanische Läsion* der Blutkörperchen erfolgt. Es fiel uns einige Male auf, daß bei längerer Stauung bei Blutentnahme aus der Armvene oder bei nicht ganz sorgfältiger Paraffinierung

Tabelle XIV.

Fibrinogen ccm	Blutkörperchen	Gerinnung	Blutkörperchen	Gerinnung
	Von Magnesiumsulfatblut, mit physiol. NaCl-Lösung gewaschen		Von Magnesiumsulfatblut, mit physiol. NaCl-Lösung gewaschen und hämolysiert	
1	5 Tropfen	—	5 Tropfen	—
1	10 „	—	10 „	—
1	15 „	—	15 „	—
1	20 „	—	20 „	—
	Von Natriumchloridblut, mit physiol. NaCl-Lösung gewaschen		Von Natriumchloridblut, mit physiol. NaCl-Lösung gewaschen und hämolysiert	
1	5 Tropfen	—	5 Tropfen	—
1	10 „	—	10 „	—
1	15 „	—	15 „	—
1	20 „	—	20 „	—
	Von Natriumfluoridblut, mit physiol. NaCl-Lösung gewaschen		Von Natriumfluoridblut, mit physiol. NaCl-Lösung gewaschen und hämolysiert	
1	3 Tropfen	+	3 Tropfen	+
1	5 „	+	5 „	+
1	7 „	+	7 „	+
1	10 „	+	10 „	+
	Von Natriumoxalatblut, mit physiol. NaCl-Lösung gewaschen		Von Natriumoxalatblut, mit physiol. NaCl-Lösung gewaschen und hämolysiert	
1	3 Tropfen	—	3 Tropfen	—
1	5 „	—	5 „	—
1	7 „	—	7 „	—
1	10 „	—	10 „	—
	Von Natriumcitratblut, mit physiol. NaCl-Lösung gewaschen		Von Natriumcitratblut, mit physiol. NaCl-Lösung gewaschen und hämolysiert	
1	3 Tropfen	—	3 Tropfen	—
1	5 „	—	5 „	—
1	7 „	—	7 „	—
1	10 „	—	10 „	—

Tabelle XV.

Fibrinogen ccm	Zusatz	Gerinnung
	NaF-Plasma (Kaninchen)	
1	10 Tropfen	—
1	20 „	—
	NaF-Plasma mit $CaCl_2$ ausgefällt	
1	10 Tropfen	—
1	20 „	—
	Thrombin dargestellt aus dem ausgefällten NaF-Plasma nach *Alexander Schmidt*	
1	10 Tropfen	+
1	20 „	+

der Geräte die Resultate nicht einheitlich verliefen. Wir gingen deshalb, um sicher zu gehen, in weiteren Versuchen dazu über, Tieren (Kaninchen) das Salz intravenös zu geben, um auf diese Weise die Blutkörperchen noch im Gefäßsystem der Einwirkung des Natriumfluorids auszusetzen, und sie so oft kaum zu vermeidenden mechanischen Einflüssen gegenüber bei der Weiterverarbeitung außerhalb der Gefäßbahn widerstandsfähiger zu machen. Als Kontrolle führten wir auch die intravenöse Injektion von Natriumoxalat aus. Die Blutmenge wurde zu $^{1}/_{13}$ des Körpergewichts angenommen und dann, wie oben ausgeführt, die übliche zur Aufhebung der Gerinnung nötige Salzmenge intravenös injiziert. Die Injektion, in die Ohrvene oder Jugularis externa, muß wegen der letalen Wirkung der Salze rasch erfolgen. Das Blut wurde sofort nach erfolgter Einspritzung aus der Carotis entnommen. Dabei wurde das Einführen einer Paraffinkanüle in dieselbe vermieden, da beim Einschieben derselben in das Gefäß ein Abstreifen des Paraffinbelags an der Kanülenspitze kaum zu vermeiden ist. Das Blut wurde deshalb, direkt aus der Carotis herausspritzend, in Paraffingefäßen aufgefangen. Es ist auch besonders darauf zu achten, daß beim Absaugen des Plasmas, ebenso beim Austarieren der mit Blut beschickten Zentrifugengläser, die Pipetten nicht nur an der Innen-, sondern auch an der Außenfläche gut paraffiniert sind, ebenso müssen alle anderen Geräte peinlichst paraffiniert und staubfrei sein. Bei der intravenösen Injektion der Salzlösungen fällt nun beim Natriumfluoridtier sofort auf, daß auch das arterielle Blut eine dunkle venöse Färbung hat, es sieht wie Erstickungsblut aus, im Gegensatz zu der unveränderten arteriellen Farbe des Oxalattierblutes.

Derartige unter allen Kautelen gewonnene Plasmata sind nun äußerst stabil. Auch das Natriumfluoridplasma zeigt auf diese Weise niemals Spontangerinnung. Es konnte auch nicht durch Ausfällung des Fluorids mit der berechneten Calciumchloridmenge, ebensowenig durch geringen Kalküberschuß zum Gerinnen gebracht werden. Von *Hekma*[1]) und neuerdings von *Barkan*[2]) wurde auf diese Spontangerinnung des Natriumfluoridplasmas hingewiesen. Nach unserer Erfahrung trifft das nur zu, wenn es zu einer mechanischen Schädigung der korpuskulären Elemente gekommen ist, die sich allerdings nur durch die intravenöse Injektion des Salzes mit Sicherheit vermeiden läßt.

Wir geben nun im folgenden die erwähnten Tierversuche zur Entnahme der Einzelheiten tabellarisch wieder.

Wir finden also in den Untersuchungen der Tabellen XVI bis XVIII unsere früheren Versuche bestätigt. Die teilweise differenten

---

[1]) *Hekma*, diese Zeitschr. **68**, 1914.
[2]) *Barkan*, ebendaselbst **186**, 1923.

Tabelle XVI.

Kaninchen 2470 g. Berechnete Blutmenge 190 ccm. 20 ccm 2proz. Natriumfluoridlösung intravenös. Die zur Gerinnung verwandte Fibrinogenlösung hatte 0,92 % NaCl-Gehalt.

Fibrinogen ccm	Blutbestandteil	Gerinnung	Blutbestandteil	Gerinnung
			Blutkörperchen, mit	
	Plasma		physiol. NaCl-Lösung	
1	20 Tropfen	—	gewaschen, hämolysiert	
1	15 „	—	15 Tropfen	—
1	10 „	—	10 „	—
1	5 „	—	5 „	—
	Plasma, mit $CaCl_2$ aus-		Blutkörperchen, mit iso-	
	gefällt		tonischer Rohrzucker-	
1	20 Tropfen	—	lösung gewaschen	
1	15 „	—	15 Tropfen	+
1	10 „	—	10 „	+
1	5 „	—	5 „	+
			Blutkörperchen, mit iso-	
			tonischer Rohrzucker-	
	Blutkörperchen, nicht		lösung gewaschen und	
	gewaschen		hämolysiert	
1	15 Tropfen	—	15 Tropfen	+
1	10 „	—	10 „	+
1	5 „	—	5 „	+
	Blutkörperchen, nicht		Kontrollen mit isoto-	
	gewaschen, hämolysiert		nischer Rohrzuckerlös.	
1	15 Tropfen	—	15 Tropfen	—
1	10 „	—	10 „	—
1	5 „	—	5 „	—
			3 „	—
	Blutkörperchen, mit			
	physiol. NaCl-Lösung			
	gewaschen			
1	15 Tropfen	—		
1	10 „	—		
1	5 „	—		

Ergebnisse der mit Kochsalzlösung gewaschenen Blutkörperchen dürften auf die vielfach nicht gleiche Dauer des Waschens, die zur Entfernung des Natriumfluorids nötig ist, bedingt sein. Es scheinen durch längeres Auswaschen mit physiologischer NaCl-Lösung die gerinnungsbeschleunigenden Stoffe verloren zu gehen. Wäscht man jedoch mit isotonischer Rohrzuckerlösung, so bleiben die betreffenden Substanzen zurück. Es sei diesbezüglich an die Untersuchungen von *Brinkman* und *van Dam*[1]) erinnert, die zeigen konnten, daß die physiologische Kochsalzlösung vor allem die Phosphatidteile der Blutkörperchen ausschwemmt, während isotonische Rohrzuckerlösung dies vermeidet. Man könnte so die Vorstellung haben, daß durch das Natriumfluorid

---

[1]) *Brinkman* und *van Dam*, diese Zeitschr. 108, 1920.

Tabelle XVII.

Kaninchen 2000 g. Berechnete Blutmenge 154 ccm. 17 ccm 2 proz. Natriumfluorid intravenös. Fibrinogen dasselbe wie Tabelle XVI.

Fibrinogen ccm	Blutbestandteile	Gerinnung	Blutbestandteile	Gerinnung
	Plasma		Blutkörperchen, mit physiol. NaCl-Lösung gewaschen, hämolysiert	
0,5	8 Tropfen	—	8 Tropfen	+
0,5	5 „	—	5 „	+
0,5	3 „	—	3 „	+
	Plasma, mit $CaCl_2$ ausgefällt		Blutkörperchen, mit isotonischer Rohrzuckerlösung gewaschen	
0,5	8 Tropfen	—	8 Tropfen	+
0,5	5 „	—	5 „	+
0,5	3 „	—	3 „	+
	Blutkörperchen, nicht gewaschen		Blutkörperchen, mit isotonischer Rohrzuckerlösung gewaschen, hämolysiert	
0,5	8 Tropfen	—	8 Tropfen	+
0,5	5 „	—	5 „	+
0,5	3 „	—	3 „	+
	Blutkörperchen, nicht gewaschen, hämolysiert		Kontrollen mit isotonischer Rohrzuckerlösung	
0,5	8 Tropfen	—	8 Tropfen	—
0,5	5 „	—	5 „	—
0,5	3 „	—	3 „	—
	Blutkörperchen, mit physiol. NaCl-Lösung gewaschen			
0,5	8 Tropfen	+		
0,5	5 „	—		
0,5	3 „	—		

die Permeabilität der Blutkörperchen in spezieller Weise geändert wird, so daß vor allem *der Durchtritt der gerinnungsbeschleunigenden Substanzen* verhindert wird. Durch nachhaltiges Auswaschen mit physiologischer Kochsalzlösung kann dieser Prozeß aufgehoben werden. Rohrzucker verhindert die Auswaschung. Auf diese Weise gelingt auch die Gerinnung der Fibrinogenlösung mit unausgewaschenen Blutkörperchen nicht, auch nicht bei Hämolyse, solange das Natriumfluorid einwirkt. Dem Austritt des Hämoglobins scheint danach derjenige der gerinnungsbeschleunigenden Substanzen nicht parallel zu gehen, solange das Natriumfluorid anwesend ist.

Eine chemische Beeinflussung ist bei der Reversibilität des Prozesses recht unwahrscheinlich. Möglich ist jedoch, daß bei der Hämolyse der Blutkörperchen auch gerinnungshemmende Substanzen nach außen gelangen. Jedenfalls fiel uns öfters auf, daß die Gerinnung in den Ver-

Tabelle XVIII.

Kaninchen 1230 g. Berechnete Blutmenge 94 ccm. 10,4 ccm 2 proz. Natriumoxalat intravenös. Fibrinogen wie Tabelle XVI.

Fibrinogen ccm	Blutbestandteil	Gerinnung
	Plasma	
0,5	8 Tropfen	—
0,5	5 „	—
0,5	3 „	—
	Serum nach Ausfällung des Oxalats mit $CaCl_2$	
0,5	8 Tropfen	+ nach 14′
0,5	5 „	+ nach 14′
0,5	3 „	+ nach 14′
	Blutkörperchen, nicht gewaschen	
0,5	8 Tropfen	—
0,5	5 „	—
0,5	3 „	—
	Blutkörperchen, nicht gewaschen, hämolysiert	
0,5	8 Tropfen	—
0,5	5 „	—
0,5	3 „	—
	Blutkörperchen, mit physiol. NaCl-Lösung gewaschen	
0,5	8 Tropfen	—
0,5	5 „	—
0,5	3 „	—
	Blutkörperchen, mit physiol. NaCl-Lösung gewaschen, hämolysiert	
0,5	8 Tropfen	—
0,5	5 „	—
0,5	3 „	—
	Blutkörperchen, mit isotonischer Rohrzuckerlösung gewaschen	
0,5	8 Tropfen	—
0,5	5 „	—
0,5	3 „	—
	Blutkörperchen, mit isotonischer Rohrzuckerlösung gewaschen, hämolysiert	
0,5	8 Tropfen	—
0,5	5 „	—
0,5	3 „	—

suchen mit gewaschenen Blutkörperchen, sobald sie hämolysiert wurden, langsamer verlief als ohne diesen Eingriff.

Die Wirkung der Gallensalze dürfte auf die *Bildung einer komplexen Fibrinogenverbindung* zurückzuführen sein. Dafür sprechen eindeutig unsere eingangs wiedergegebenen Alkoholfällungs- und Reibungsversuche. Die Durchführung dieser Versuche am Gesamtblut war uns in einwandfreier Weise nicht möglich, da die Gallensalze starke Hämolyse hervorrufen. Dadurch konnte eine exakte Trennung in die einzelnen Blutbestandteile, wie in den oben angeführten Versuchen,

nicht vorgenommen werden. Auch bei abgestuften Konzentrationen, soweit überhaupt noch eine Gerinnungsverzögerung erreichbar war, gelang es uns nie, die Hämolyse zu vermeiden.

Wir glauben so auf Grund unserer Untersuchungen die *Neutralsalze bezüglich ihrer Fähigkeit die Blutgerinnung zu hemmen in zwei Gruppen* einteilen zu müssen. Die *erste* Gruppe umfaßt die *Oxalate, Citrate, gallensauren Salze, das Magnesiumsulfat und Natriumchlorid*. Sie verhindern durch die *Bildung komplexer, ionisierter Fibrinogensalzverbindungen* die Gerinnung. Als Repräsentant der davon grundsätzlich verschiedenen *zweiten Gruppe* wäre das *Natriumfluorid* zu betrachten. Es verhindert den *Austritt der gerinnungsbeschleunigenden Substanzen aus den korpuskulären Elementen des Blutes*. Es greift also im Gegensatz zu der ersten Gruppe *nicht* an den *Plasmaeiweißkörpern* an. Man könnte sich vorstellen, daß die Natriumfluoridwirkung vor allem auf die *Membran* der Blutkörperchen in der Weise einwirkt, daß die *Permeabilität* aufgehoben, also eine Art von *Blockade der Zellmembran*, wenigstens für bestimmte Substanzen, hervorgerufen wird. Dafür sprechen auch die Tierversuche mit intravenöser Injektion. Wir haben bei Besprechung derselben schon darauf hingewiesen, daß die Tiere an Erstickung zugrunde gehen, daß das arterielle Blut venösen Charakter zeigt, daß also zweifelsohne auch darin die gestörte Permeabilität der Blutkörperchenmembran zum Ausdruck kommt. Ein derartiges durch intravenöse Injektion von Natriumfluorid gewonnenes Plasma zeigt, wie schon oben angegeben, keinerlei Spontangerinnung. Es läßt sich auch durch Kalkzusatz nicht mehr zum Gerinnen bringen, einerlei, ob man das Natriumfluorid durch die berechnete Kalkmenge eben zur Ausfällung bringt, oder ob man einen Kalküberschuß in variierten Mengen zufügt. Wir glauben deshalb nicht, daß der Kalkeliminierung beim Natriumfluoridblut bezüglich der Gerinnungsaufhebung eine wesentliche Bedeutung zukommt, sondern daß nur die *Permeabilitätsänderung der Blutkörperchenmembran*, wobei wir unter letzteren die Gesamtheit der korpuskulären Blutelemente verstehen, das Ausschlaggebende ist.

Morawitz ließ unlängst in einer Arbeit durch *Barkan*[1]) die in der *Hekma*schen Theorie postulierte Reversibilität der Fibringerinnung widerlegen. Ein Beweis gegen die kolloidchemische Erklärung des Gerinnungsprozesses ist dadurch jedoch nicht gegeben. Man mag im Zweifel darüber sein, ob, wie *Hekma* behauptet, das Fibrinogen als Alkaliverbindung, als Alkalihydrosol des Fibrins, im Plasma vorhanden ist. Wir selbst sind in letzter Zeit auch zu der Überzeugung gelangt, daß die *Hekma*sche Theorie in diesem Punkte kaum aufrechtzuerhalten

---

[1]) l. c.

ist. Unsere theoretischen Vorstellungen gingen dabei von den elektroosmotischen Untersuchungen *Ruppels*[1]) aus. Er konnte zeigen, daß ein Übergang von Albumin in Pseudoglobulin und Euglobulin stattfindet, und zwar nicht nur im Reagenzglas, sondern auch im Organismus. Diese in Anbetracht der Immunisierungsverhältnisse grundlegenden Untersuchungen *Ruppels* scheinen uns auch für das hier in Frage stehende Gebiet von besonderer Bedeutung. Die *rein chemische* Betrachtungsweise der *Bluteiweißkörper* im Sinne einer durchgreifenden Verschiedenheit erscheint uns damit sehr in Frage gestellt, es dürften vielmehr nur rein *physikalisch-chemische Varianten chemisch gleichartiger* Körper vorliegen. Auf der einen Seite das *lyophile Albumin*, auf der anderen Seite das *lyophobe Globulin* mit dazwischen liegenden Übergangsstufen. Gerade das *Fibrinogen* bzw. das Fibrinsol dürfte von den Globulinen als am *meisten lyophob* zu betrachten sein. Das zeigt sich schon in seiner leichteren Aussalzbarkeit und seiner besonderen Empfindlichkeit gegenüber quantitativen Änderungen seiner Neutralsalzlösungsmittel, worauf wir schon in unserer früheren Arbeit hingewiesen haben. Solche lyophoben Kolloide benötigen die *Anwesenheit von Neutralsalzen* zu ihrer Lösung in *optimaler* Quantität, sie sind diesseits und jenseits dieses Optimums leicht ausflockbar. Die vielfach in der Literatur vorhandenen Widersprüche bezüglich der Fibrinogengerinnung dürften unseres Erachtens vielfach auf der Nichtbeachtung des gerade für den Gerinnungsablauf so überaus wichtigen Salzgehaltes der Fibrinogenlösungen beruhen. Auch die Beobachtung *Barkans* von der Gerinnung eines salzempfindlichen Alkalifibrinogens durch Natriumoxalat ist ein kolloidchemisches Postulat. Das Alkalifibrinogen ist weitgehend ionisiert und wird durch jedes Neutralsalz in seiner Ionisation zurückgedrängt.

In dieser Weise scheint uns das *Fibrinogen* (*Fibrinsol*) *als besonders hydrophobes Kolloid*, auch als *Gerinnungskörper* besonders *geeignet*. Wir möchten vermuten, daß das *Fibrinogen* als *Neutralsalzverbindung* im Plasma gelöst vorhanden ist, vor allem wäre hier an das Kochsalz zu denken. Alle hydrophoben Kolloide sind in ihrem Solzustand sehr labil. Kolloidchemische Einflüsse der verschiedensten Art, wie Neutralsalze, besonders der zweiwertigen Kationen, oberflächenaktive Substanzen usw., führen sie leicht in den Gelzustand über. So ist leicht verständlich, daß die Blutgerinnung infolge der Labilität des hydrophoben Fibrinogens in der verschiedenartigsten Weise beeinflußt werden kann. Und es ist auch ebenso begreiflich, daß der unbedingte Anhänger der Fermenttheorie in all diesen Möglichkeiten leichter Beeinflußbarkeit den Ausdruck verschiedenster fermentativer Einflüsse

[1]) *Ruppel*, Deutsche med. Wochenschr. 2, 1923.

zu erblicken glaubt. Das erscheint uns jedoch verfehlt, wir sehen in dem *Blutgerinnungsprozeß nur ein physikalisch-chemisches Geschehen* in einem Gemisch von lyophilen und lyophoben Kolloiden. Daß dabei den letzteren für den Gerinnungsablauf die Hauptrolle zufällt, ist nach dem Gesagten einleuchtend. Wir betrachten so das lyophobe Fibrin als das Gel des Fibrinogens, letzteres als das Neutralsalzhydrosol des Fibrins. Dieses Fibrinsol dürfte in dem Salzgehalt des Plasmas seine besten Lösungsbedingungen finden und als besonders hydrophobes Kolloid nach den Gesetzen der Kolloidchemie ein ausgesprochen empfindliches Gerinnungssubstrat darstellen.

Nachtrag zur Korrektur.

Während der Drucklegung dieser Arbeit erschien eine kurze Mitteilung von *Wöhlisch*: Die Rolle des Thrombins bei der Gerinnung des Blutes[1]). *Wöhlisch* bestätigt darin unsere früheren experimentellen Versuche über die Thrombinwirkung[2]), glaubt ihnen aber eine andere Deutung geben zu müssen. Er betrachtet die Thrombinwirkung als eine Verschiebung des isoelektrischen Punktes des Fibrinogens aus dem sauren nach dem neutralen Gebiete zu und setzt diesen Vorgang in Analogie zur Hitzegerinnung des Fibrinogens. *Wöhlisch* greift zunächst auf Arbeiten des einen von uns mit *Funck* zurück[3]), in denen wir den isoelektrischen Punkt des salzfrei dialysierten Fibrinogens mit $p_H = 5{,}0$ angaben. Er bezweifelt, ob wir überhaupt genuines Fibrinogen in den Händen gehabt hätten, da eine Veränderung unserer Fibrinogenlösung durch die Dialyse gegen Alkali nicht ausgeschlossen sei. Daß eine kurzdauernde Dialyse gegen Spuren von Alkali eine Denaturierung des Fibrinogens bedingen sollte, ist unseres Erachtens kaum wahrscheinlich. Außerdem sind aber die Einwände von *Wöhlisch* durch seine eigenen Untersuchungen widerlegt, da er selbst für den isoelektrischen Punkt seines Fibrinogens denselben Wert findet wie wir, nämlich: $p_H = 4{,}86$ bis $5{,}0$. Viel eher erscheint uns dieser gegen unsere Versuche erhobene Einwand für die von *Wöhlisch* durchgeführte Bestimmung des isoelektrischen Punktes des Fibrins berechtigt. Bekanntlich ist das Fibrin, wenn man nicht tief eingreifende Reinigungsverfahren anwendet, nie rein darzustellen. Es ist immer durch eingeschlossene korpuskulare Blutelemente verunreinigt. Es ist äußerst schwer löslich, und seine langsame Lösung in Neutralsalzen wird auf die Wirkung beigemengter proteolytischer Fermente zurückgeführt. Es sollen sich dementsprechend bei der Lösung des Fibrins verschiedene Globuline vorfinden, teilweise auch Albumosen und Peptone. Es müssen also unseres Erachtens Differenzen im isoelektrischen Punkte zwischen Fibrinogen und Fibrin sehr vorsichtig bewertet werden. Außerdem verliert das ausgeflockte Fibrinogen (Fibrin) bekanntermaßen sehr rasch seine Löslichkeit. Es treten also nach der Ausfällung sofort Änderungen seines physikalisch-chemischen Charakters ein, wie wir sie auch von anderen Gelen kennen. Es erscheint also fraglich, inwieweit wir es dabei noch mit einem unveränderten Eiweißkörper zu tun

---

[1]) Klin. Wochenschr. 1923, Nr. 23, und Kieler med. Gesellsch., Referat in Münch. med. Wochenschr. 1923, Nr. 23.

[2]) Diese Zeitschr. **134**, 1922.

[3]) Ebendaselbst **124**, **126**, 1921.

haben. Auch diese Tatsache läßt Verschiebungen des isoelektrischen Punktes weit eher als sekundäre Veränderungen erscheinen, die mit dem Ablauf des Gerinnungsprozesses gar nichts zu tun zu haben brauchen.

Die Deutung unserer Thrombin-Membranversuche, die das Wesen der Thrombinwirkung als einen Quellungsprozeß des letzteren, wodurch dem Fibrinogen sein Lösungsmittel entzogen wird und dadurch die Gerinnung erfolgt, definiert, glaubt *Wöhlisch* ablehnen zu müssen, da er nachwies, daß eine Fibrinogenlösung auch durch Dialyse gegen eine Thrombinlösung von geringerem Kochsalzgehalt, wobei der Wasserstrom vom Thrombin zum Fibrinogen geht, zum Gerinnen gebracht wird. Dieser Versuch von *Wöhlisch* ist nun durchaus kein Beweis gegen unsere Anschauungen. *Wöhlisch* sagt damit uns längst Bekanntes, das hätte er schon aus unserer oben erwähnten Arbeit (Tabelle VI) entnehmen können, wo wir rein wässerige Thrombinlösungen in Anwendung brachten. Daß dabei zunächst ein Wasserstrom nach der Fibrinogenlösung zu einsetzen muß, ist eigentlich selbstverständlich, und ebenso, daß infolgedessen der Flüssigkeitsspiegel in der Manometerröhre sinkt. Aber ebenso klar ist es auch — und darauf geht *Wöhlisch* nicht ein —, daß nachträglich Kochsalz in die Thrombinlösung eindringt und ein Druckausgleich einsetzt, ja der Druck durch die nun einsetzende Quellung des Thrombins in dem kochsalzreicheren Dispersionsmittel ansteigt. Wir können also in der *Wöhlisch*schen Versuchsanordnung nur eine Wiederholung und Bestätigung unserer eigenen Versuche erblicken, aber jedenfalls keine Widerlegung, sondern wir müssen an unserer Ansicht, daß das Wesen der Thrombinwirkung in einer Quellung des letzteren und dadurch bedingten Wegnahme des Lösungsmittels des Fibrinogens beruhe, voll und ganz festhalten. Das Prinzipielle bei der Thrombinwirkung ist überhaupt die Frage: Ist das Thrombin ein Ferment? Das glauben wir durch unsere Membranversuche zum erstenmal in exakter Weise experimentell widerlegt zu haben. Ebenso glauben wir, das Thrombin als artifizielles Produkt mit großer Wahrscheinlichkeit charakterisiert zu haben. Für die daraus sich ergebende differente Wirkung von Thrombin und Serum haben wir in dieser Arbeit erneut einen Beweis erbracht, kommen darauf später aber noch genauer zurück. Das Thrombin ist ein Gemisch von Plasmaeiweißkörpern (Albumin, Globulin, auch Fibrinogen). Wir werden in einer folgenden Arbeit zeigen, daß man eine Fibrinogenlösung durch wasserfreies Fibrinogen zum Gerinnen bringen kann, hier versagt die Vorstellung von *Wöhlisch* vollkommen. Auch aus den Schlußfolgerungen der vorliegenden Arbeit geht ohne weiteres hervor, daß wir der Ansicht sind, daß die Hypothese von *Wöhlisch* das Gerinnungsgeschehen in seinen Einzelheiten wohl kaum erklären dürfte. Zudem vermögen wir in ihr nichts prinzipiell Neues zu erblicken, da auch die Hitzegerinnung des Fibrinogens eine Dehydratation desselben bedingt. Wir können deshalb unsere experimentell gestützten einfachen Vorstellungen nicht ändern, da uns die *Wöhlisch*sche Ansicht nach den bis jetzt vorliegenden Mitteilungen nicht genügend begründet und, wie aus obigen ersichtlich, auch aus „physikalisch-chemischen Gründen" unwahrscheinlich erscheint.

Zur Kenntnis der Blutkatalase.

Von

Mitsutaro Tsuchihashi.

(Aus dem biochemischen Laboratorium des Krankenhauses Moabit in Berlin.)

(Eingegangen am 5. Juni 1923.)

Einleitung.

Man hat schon mit verschiedenen Methoden die Reinigung der Blutkatalase versucht. Wenn es bisher noch nicht gelungen ist, die Katalase in einer reinen und dabei hoch wirksamen Form zu erhalten, so ist das in der großen Empfindlichkeit des Enzyms gegenüber den angewandten chemischen Substanzen begründet.

Unter den Methoden, welche am häufigsten zur Enzymisolierung angewandt worden sind, sind zu erwähnen:

1. Die Verfahren, welche das Enzym mit dem begleitenden Eiweiß zusammen fällen und aus dem erhaltenen Niederschlage das Enzym extrahieren, während das Eiweiß ungelöst bleibt.

2. Die Adsorption des Enzyms und die nachfolgende Elution. Diese Verfahren hat bekanntlich *Willstätter* theoretisch weitgehend durchgearbeitet und sie praktisch mit großem Erfolge angewandt.

Senter[1]) hat lackfarbig filtriertes Blut mit Äthylalkohol gefällt und den Niederschlag getrocknet. Aus dem so erhaltenen Präparat extrahierte er die Katalase mit Wasser.

Nach einem ähnlichen Verfahren haben *Ewald*[2]), *Euler*[3]) und andere gearbeitet. Das Ziel dieser Versuche war, zuerst die Katalase gemeinsam mit dem Hämoglobin auszufällen und sie dann durch Extraktion vom Hämoglobin zu trennen.

Eine andere Methode ist von *Wolff* und *Stöcklin*[4]) angewandt worden, die im Gegensatz zu der oben angeführten darin besteht, daß die Hauptmenge des Oxyhämoglobins durch Auskristallisieren mit Hilfe von Alkohol beseitigt und die Katalase in der Lösung zurück-

---

[1]) *Senter*, Zeitschr. f. physikal. Chem. **44**, 1903.
[2]) *Ewald*, Pflügers Arch. **116**, 1906.
[3]) *H. Euler*, Hofmeisters Beitr. **7**, 1906.
[4]) *Wolff* und *Stöcklin*, C. r. **152**, 1911.

gelassen wird. Eine ähnliche Methode benutzte *Madinaveitia*[1]. Nach seinem Verfahren wird der größte Teil des Hämoglobins mit Äther und Schwefelsäure gefällt und der Rest weiter durch Schütteln mit Äther beseitigt. Er hat auch versucht, durch Adsorption die Katalase zu reinigen, wie es in Abschnitt II genauer besprochen wird.

Bei der Reinigung der Katalase aus anderen Substanzen, wie z. B. Leber, Fett usw., wird häufig Alkohol und Äther angewandt. *Jacoby*[2]) hat bei der Reinigung der Bakterienkatalase Aussalzungen mit Ammonsulfat, Magnesiumsulfat und Kochsalz ausgeführt. Auch Methylalkohol hat sich als gutes Fällungsmittel nach den Angaben von *Jacoby*[3]) bei der Bakterienkatalase bewährt.

Die bis jetzt bei der Reinigung der Katalase aus dem Blut angewandten Methoden sind nicht ganz befriedigend. Denn bei *einer* Methode stört die schädigende Wirkung der Fällungsmittel, bei der anderen ist die Ausführung nicht so einfach. Das Ziel der Versuche muß sein, ein möglichst von Beimengungen befreites Präparat von einer Wirksamkeit zu erhalten, die möglichst der Anfangswirksamkeit entspricht, und außerdem muß die Methode einfach sein.

Auf Anregung von Herrn Prof. *Jacoby* habe ich versucht, in dieser Richtung hin mich zu beschäftigen und den oben angeführten Forderungen bei der Katalasereinigung soweit wie möglich entgegenzukommen.

Es lag nahe, neben der von mir zum ersten Male angewandten Chloroformmethode zur Isolierung der Katalase auch die Adsorption und nachfolgende Elution und endlich auch eine Kombination der beiden Verfahren zu versuchen. Zunächst werde ich die allgemeine Methodik besprechen und dann in Teil I die Chloroformmethode, in Teil II die Adsorptionsversuche schildern, in Teil III folgen dann die kombinierten Versuche. Zum Schluß werden wir die Resultate zusammenfassend besprechen.

Allgemeine Methodik.

Der zeitliche Verlauf der H_2O_2-Spaltung durch Katalase bei starker Verdünnung der H_2O_2-Lösung kann nach *Senter*[4]) durch die Gleichung der monomolekularen Reaktion ausgedrückt werden, und die dabei gewonnenen K-Werte sind proportional der zugesetzten Enzymmenge. Nach den eingehenden Untersuchungen von *Waentig* und *Steche*[5]) entspricht der Reaktionsverlauf der H_2O_2-Zersetzung im

[1]) *Madinaveitia*, Dissertation, Zürich 1912.

[2]) *M. Jacoby*, diese Zeitschr. **89**, 1918.

[3]) *Derselbe*, ebendaselbst **95**, 1919.

[4]) *Senter*, Zeitschr. f. physik. Chem. **44**, 1903; **51**, 1905.

[5]) *Waentig* und *Steche*, Zeitschr. f. phys. Chem. **72**, 1911; **76**, 1912; **79**, 1912.

allgemeinen nicht dem Schema der Reaktion erster Ordnung. Immerhin unter bestimmten Versuchsbedingungen besteht eine annähernde Proportionalität zwischen der Fermentkonzentration und den aus den in der ersten Phase der Reaktion stattfindenden H_2O_2-Abnahmen nach der Reaktionsgleichung erster Ordnung berechneten K-Werten. Daher empfiehlt es sich, die Katalasewirkung durch diese K-Werte auszudrücken. Nach *Morgulis*[1]) soll der Gang der Spaltung des H_2O_2 durch Katalase von dem jeweiligen Mengenverhältnis Ferment-H_2O_2 abhängig sein. Wird bei einer reichlichen Menge von Ferment der größte Teil des H_2O_2 zersetzt, so entspricht die Spaltung der Formel einer monomolekularen Reaktion; reicht die Fermentmenge nur zur Spaltung von etwa 70 bis 80% des vorhandenen H_2O_2 aus, so nimmt die Spaltung einen „bimolekularen" Verlauf. Dazwischenliegende Spaltungswerte können gut durch die Formel einer anderthalb-molekularen Reaktion dargestellt werden.

Rona und *Damboviceanu*[2]) konnten bei ihren Versuchen über Leberkatalase diese Angaben von *Morgulis* bestätigen.

Bei meinen Untersuchungen benutzte ich 100 ccm einer etwa n/100 H_2O_2-Lösung, die als Puffer 10 ccm einer Mischung von m/15 zweibasischem Natriumphosphat und m/15 einbasischem Kaliumphosphat enthielt. Die molare Konzentration des Phosphatgemisches war in dieser H_2O_2-Lösung eine m/150 und die Wasserstoffionenkonzentration betrug $p_H = 7$, gemessen nach der Indikatormethode von *Michaelis* und *Gyemant*. Die Lösung wird also in der Nähe der optimalen Reaktion gehalten. Je 100 ccm der oben angeführten H_2O_2-Lösung wurden im *Erlenmeyer*schen Kolben verteilt und in einem Bad von schmelzendem Eis so lange gehalten, bis die Lösung eine Temperatur von 2° C angenommen hatte. Das m/150 Phosphatgemisch wurde ebenfalls im gleichen Bade auch bis auf 2° C abgekühlt. Nach der Erreichung dieser Temperatur wurde die zu prüfende Fermentlösung in geeigneter Weise mit dem abgekühlten Phosphatgemisch verdünnt, und zwar wurden in einer Probe 10 ccm Fermentlösung sofort dem H_2O_2 zugesetzt, in einer anderen wurden 5 ccm Fermentlösung mit 5 ccm Phosphatgemisch zusammengebracht und dieses Gemisch sofort zum H_2O_2 hinzugefügt. Die Gesamtmenge betrug also 110 ccm und die H_2O_2-Konzentration war unter n/100.

Sofort nach der Zusetzung der Fermentlösung wurden die Gemische durch ganz leichte Schwenkungen gemischt und auf eine bestimmte Zeit in demselben Bade ruhig stehengelassen. Im Kontrollversuche wurden an Stelle der Fermentlösung 10 ccm Phosphatgemisch verwendet. Nach Ablauf dieser Zeit wurden zu jedem 20 ccm einer 20 proz. H_2SO_4-Lösung hinzugesetzt und mit n/20 Kaliumpermanganatlösung titriert. Das für diese Versuche benutzte destillierte Wasser war immer durch Kochen von Kohlensäure freigemacht. Das H_2O_2 wird aus Perhydrol „chemisch rein säurefrei" von *Merck* hergestellt; Perhydrol (Tropenpackung) habe ich niemals benutzt. Das Perhydrol wurde auf die Hälfte mit destilliertem

[1]) *Morgulis*, Journ. of biol. Chem. 47, 1921.
[2]) *Rona* und *Damboviceanu*, diese Zeitschr. 134, 1922.

Wasser verdünnt und als Stammlösung in einer verschlossenen Flasche im Eisschrank aufbewahrt. Die bei den Kontrollversuchen auftretenden geringen Schwankungen in den erhaltenen Werten sind durch Zersetzungen von H_2O_2 während der Aufbewahrungszeit zu erklären. Die bei den Versuchen benutzten Gegenstände waren immer besonders gereinigt. Aus den erhaltenen Werten der $KMnO_4$-Lösung habe ich die Geschwindigkeitskonstante (K) nach der Gleichung der monomolekularen Reaktion $K = 0{,}4343\,k = 1/t \log \frac{a}{a-x}$ berechnet, wobei a die Anfangskonzentration, x die gespaltene H_2O_2-Menge in dem betreffenden Zeitpunkt bedeutet, die in n/20 Kaliumpermanganat ausgedrückt werden. t bedeutet die Zeit in Minuten.

Die K-Werte habe ich zweimal im Zeitpunkt von 10 und 20 Minuten oder einmal im Zeitpunkt von 20 Minuten berechnet. Wie aus den unten gebrachten Tabellen ersichtlich ist, sind die K-Werte im Zeitpunkt von 20 Minuten im Vergleich zu denen von 10 Minuten kleiner. Immerhin sind die in solchen kurzen Zeitabschnitten und unter genau den gleichen Versuchsbedingungen gewonnenen K-Werte, im Bereich der zum Vergleich benutzten Fermentkonzentration, der zugesetzten Fermentmenge fast proportional. Ich glaube daher, daß mit denselben die Wirksamkeit genügend verglichen werden kann.

1. Die Chloroformmethode.

Es wird allgemein angenommen, daß die Katalase im Blut sich fast nur in den Erythrocyten befindet und auch das Hämoglobin mit der Katalase nicht identisch ist. Ich war daher bestrebt, die Katalase vom Hämoglobin zu trennen. Als eins der geeignetsten Fällungsmittel habe ich nach langem Suchen schließlich das Chloroform gefunden. Nach den Untersuchungen von *Krüger*[1]) wird das Hämoglobin durch Chloroform auch bei Zimmertemperatur quantitativ ausgefällt, und zwar in folgender Weise. Eine bei 15° C gesättigte wässerige Hämoglobinlösung wird mit einem bedeutenden Chloroformüberschuß im Laufe des Tages zehn- bis zwölfmal heftig geschüttelt und dann über Nacht ruhig stehen gelassen. Die obenstehende farblose, ein wenig getrübte Flüssigkeit wird durch Filtration vollkommen farblos und wasserklar. Das erhaltene Filtrat zeigt keine Adsorptionsstreifen und gibt nicht die empfindlichen Eiweißreaktionen.

Außerdem hat das Chloroform noch einen Vorteil, daß es gleichzeitig die lipoiden Substanzen beseitigt.

In der Literatur fand ich bis jetzt keine Angaben über die Benutzung von Chloroform zur Reinigung von Blutkatalase. Es hat natürlich mit unserer Frage nichts zu tun, wenn *Loew*[2]) Chloroformwasser zur Extraktion von Katalasen aus den Tabakblättern anwandte und *Issajew*[3]) ebenfalls für die Extraktion derselben aus Hefe. Nach den Untersuchungen von

[1]) *Krüger*, Zeitschr. f. Biol. **41**, 1901.

[2]) *P. Loew*, Washington Bullet. of U. S. Depart. of Agricult. **68**, 1900, zitiert nach *Wohlgemuth*.

[3]) *Issajew*, Zeitschr. f. phys. Chem. **42**, 1904.

Choay[1]) soll die Entfernung der Lipoidsubstanzen der Schweineleber durch Chloroform die Wirksamkeit des Rückstandes begünstigen. Auch *Euler*[2]) und seine Schüler geben an, daß das Chloroform die Katalasewirkung der frischen Hefezellen sehr stark aktivieren soll. Weiter gibt der gleiche Verfasser[3]) an, daß das Chloroform die Katalasewirkung der roten Blutkörperchen 10 bis 15 % verstärkt. Aber da dabei eine erhebliche Beeinflussung der Plasmolyse bemerkbar war, so soll die Aktivierung nach der Meinung des Verfassers keine reine Erscheinung sein. Aus den vorliegenden Untersuchungen könnte man also vermuten, daß das Chloroform auf die Katalase nicht störend, sondern vielleicht sogar aktivierend einwirkt.

Experimentelles.

Bei den ersten Versuchen habe ich ein aus Pferdeblutkörperchen hergestelltes Pulver benutzt. Die Herstellung geschah in folgender Weise: etwa 3000 ccm geschlagenes Pferdeblut wurde einen Tag lang stehengelassen. Die zu Boden gesunkenen Blutkörperchen wurden vom Serum getrennt, mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen und von der Waschflüssigkeit abgetrennt. Die erhaltenen Blutkörperchen wurden, um die enthaltenen Salze zum größten Teil zu entfernen, etwa 24 Stunden in Pergamentschläuchen gegen destilliertes Wasser dialysiert. Dann wurde die während der Dialyse lackfarbig gewordene Blutkörperchenlösung im *Faust-Heim*schen Apparat bei Zimmertemperatur getrocknet. Die dabei erhaltene Trockensubstanz wurde gepulvert. Das erhaltene Pulver wog etwa 372 g. Es wurde etwa 2 Wochen im Exsikkator stehengelassen und in einer Flasche mit Paraffin luftdicht verschlossen und im Eisschrank aufbewahrt.

Dieses Pulver löste sich nicht ganz vollständig im Wasser. Die getrübte Lösung wurde zentrifugiert und filtriert. Die Wirksamkeit war folgende:

Tabelle I.

Unverdünnte Lösung	Unfiltrierte Lösung $a - x$		Filtrierte Lösung $a - x$	
	$t = 10'$	$t = 20'$	$t = 10'$	$t = 20'$
ccm	ccm	ccm	ccm	ccm
0,2	9,6	4,9	9,7	5,1
0,1	13,8	10,0	13,9	10,0
0	19,9	—	—	—

Bei den unten folgenden Versuchen habe ich ein Pulver etwa 7 Monate nach seiner Herstellung benutzt und dabei die wichtigsten Bedingungen der Chloroformanwendung untersucht. Aber selbstverständlich glaube ich nicht, daß die hier ermittelten Versuchsbedin-

[1]) *Choay*, Journ. de Pharm. **8**, 1911.

[2]) *Euler* und *Blix*, Zeitschr. f. phys. Chem. **105**, 1919; *Euler* und *Laurin*, ebendaselbst **106**, 1919.

[3]) *Euler* und *Borgenstam*, diese Zeitschr. **102**, 1920.

gungen für alle anderen Blutlösungen genau in gleicher Weise gültig sind. Denn die Ergebnisse der Versuche können erstens von dem Eiweißgehalt der Ausgangslösung abhängig sein und zweitens müssen der Salzgehalt und die Azidität der Ausgangslösungen eine Rolle spielen. Außerdem kann wahrscheinlich die Aufbewahrungszeit des Pulvers von Bedeutung sein. Aber ich glaube auf Grund meiner Versuche, daß die mit diesem Pulver ermittelten Bedingungen mit kleinen Unterschieden für alle Fälle anwendbar sind. Denn wir haben auch bei einem anderen Pulver gute Resultate erhalten und entsprechende Ergebnisse auch bei frischem Blut.

Die Versuche mit Chloroform wurden in folgender Weise angestellt. Als Chloroform wurde Chloroformium D. A. B. 5 (*Kahlbaum*) benutzt. Das Blutpulver wurde in destilliertem Wasser 1proz. aufgelöst, dann zentrifugiert und abfiltriert. Der N-Gehalt dieses Filtrats bzw. der Ausgangslösung betrug etwa 130 mg in 100 ccm, wenn auch kleine Schwankungen nach dem Lösungszustand des Pulvers unvermeidlich waren. 100 ccm dieser Lösung und 20 ccm Chloroform wurden in einen 240 ccm fassenden kugelförmigen Scheidetrichter gebracht und während 20 Minuten mit Unterbrechungen stark geschüttelt; dabei betrug die Gesamtzeit des Schüttelns 5 Minuten. Durch das Schütteln trat immer mehr eine recht starke und schwer absetzbare Trübung ein. Das Gemisch wurde kräftig zentrifugiert. Die obenstehende Flüssigkeit wurde darauf durch Filtration von dem dicken, ziegelroten Niederschlag und dem Chloroform abgetrennt. Das Filtrat betrug 95,5 ccm; es war klar und hatte nur einen schwach gelben Ton. Von einer braunen Farbe war nichts mehr zu sehen. Die Wasserstoffionenkonzentration des Filtrats zeigte $p_H = 6,6$.

Bei Zusatz von Sulfosalicylsäure zeigte die Lösung eine ziemlich deutliche Trübung, obwohl dieselbe nicht zu vergleichen war mit der Trübung der Ausgangslösung, die sehr stark ausfiel. Die Lösung hatte, wie in allen entsprechenden Versuchen, einen Chloroformgeruch, da ich das Chloroform nie besonders entfernt hatte.

Die Wirksamkeit des Filtrats bzw. der gereinigten Lösung war folgende:

Tabelle II.

Unverdünnte Lösung	Ausgangslösung					Gereinigte Lösung					Ausbeute $\frac{K''}{K'}$
	$t = 10'$		$t = 20'$		Durchschnittl. K-Werte K'	$t = 10'$		$t = 20'$		Durchschnittl. K-Werte K''	
ccm	$a - x$ ccm	K	$a - x$ ccm	K		$a - x$ ccm	K	$a - x$ ccm	K		%
0,2	9,7	0,0314	5,1	0,0297	0,0306	11,7	0,0233	7,6	0,0210	0,0222	73
0,1	13,9	0,0158	10,2	0,0146	0,0152	15,2	0,0119	12,3	0,0106	0,0113	74
0	20,0	—	—	—	—	20,0	—	—	—	—	—

Wie aus dieser Tabelle ersichtlich ist, beträgt die Wirksamkeit der gereinigten Lösung etwa 74% im Vergleich mit der Ausgangslösung. Bei jedem Versuch habe ich mit den aus diesem Pulver hergestellten Lösungen unter gleichen Bedingungen immer ungefähr gleiche Resultate erhalten.

Ich habe bei diesem Versuch die Wirksamkeit des durch Chloroform entstandenen Niederschlages geprüft. Dabei wurde der Niederschlag von dem untenstehenden Chloroform möglichst befreit und im Wasser verteilt. Dabei löste sich der Niederschlag anscheinend nicht auf. Um noch darin enthaltene Reste von Chloroform zu entfernen, habe ich die Lösung in den *Faust-Heim*schen Apparat für etwa 1 Stunde gebracht. Dann wurde Wasser bis zu dem ursprünglichen Volumen zufügt. Auch jetzt hatte diese Lösung noch etwas Chloroformgeruch.

Tabelle III. Prüfung der Aufschwemmung des durch Chloroform entstandenen Niederschlages.

Unverdünnte Lösung ccm	$t = 10'$		$t = 20'$	
	$a - x$ ccm	K	$a - x$ ccm	K
0,2	17,2	0,0066	15,2	0,0060
0,1	18,5	0,0034	17,7	0,0027
0	20,0	—	—	—

Wie aus diesem Versuche ersichtlich ist, enthielt die Aufschwemmung des Niederschlages wenig Katalase. Diese Aufschwemmung wurde filtriert, das gewonnene, wasserklare Filtrat wirkte sehr wenig. Folglich befindet sich die im Niederschlage übergegangene Katalase in im Wasser unlöslichem Zustande.

Die durch Chloroform gereinigte Lösung wurde mit einigen Tropfen Chloroform versetzt und in einer sorgsam gereinigten Flasche fest verschlossen im Eisschrank aufbewahrt. Im Laufe von Tagen zeigten sich gewöhnlich in der Lösung wenige ganz feine membranartige Partikelchen, dabei blieb die Lösung selbst ganz klar. Nach Ablauf von 4 Wochen wirkte die gereinigte Lösung, deren ursprüngliche Wirksamkeit in Tabelle II geschildert worden war, in folgender Weise. Die vorhandenen Partikelchen wurden durch Filtration entfernt.

Tabelle IV.

Unverdünnte Lösung ccm	$t = 10'$		$t = 20'$	
	$a - x$ ccm	K	$a - x$ ccm	K
0,2	12,0	0,0222	8,1	0,0196
0,1	15,3	0,0116	12,7	0,0099
0	20,0	—	—	—

Wie aus dem Vergleich von Tabelle II und IV ersichtlich ist, findet keine merkliche Verminderung der Wirksamkeit statt.

Wie ich schon oben mitgeteilt habe, war die Ausbeute der Katalase unter bestimmten Bedingungen etwa 70 %. Das war das beste Resultat, das bei diesem Pulver zu erzielen war.

Die angewandte Chloroformmenge betrug immer $^1/_5$ Volumen der Ausgangslösung, diese Menge war genügend. Zum Schütteln habe ich keinen besonderen Apparat angewandt, sondern es nur mit den Händen kräftig ausgeführt, und ich glaube, daß das Schütteln dabei gleichmäßig ausgeführt wurde.

Bei einer bestimmten Menge der Ausgangslösungen und des Chloroforms ist das Volumen des Schütteltrichters von Wichtigkeit. Bei meinen Versuchen habe ich immer 50 ccm der Ausgangslösung und demgemäß 10 ccm Chloroform in einen Kugeltrichter von 120 ccm Inhalt gebracht, und bei Anwendung einer doppelten Menge derselben Lösungen habe ich auch einen Kugeltrichter von doppeltem Inhalt also von 240 ccm Inhalt benutzt.

Bei dem folgenden Versuch wurden 50 ccm der Ausgangslösung und 10 ccm Chloroform in einen Kugeltrichter von 240 ccm Inhalt anstatt 120 ccm Inhalt gebracht und im ganzen 5 Minuten geschüttelt. Darauf wurde das Gemisch zentrifugiert und die oben stehende Flüssigkeit abfiltriert. Das Filtrat sah etwas blasser aus als das Filtrat, das in einem Trichter von 120 ccm Inhalt ebensoviel Minuten geschüttelt wurde. Auch bei Zusatz von Sulfosalicylsäure war die Trübung bei diesem Filtrat geringer.

Tabelle V.

Unverdünnte Lösung	Ausgangslösung					Gereinigte Lösung					Ausbeute $\frac{K''}{K'}$
	$t = 10'$		$t = 20'$		Durchschnittl. K-Werte	$t = 10'$		$t = 20'$		Durchschnittl. K-Werte	
ccm	$a - x$ ccm	K	$a - x$ ccm	K	K'	$a - x$ ccm	K	$a - x$ ccm	K	K''	%
0,2	10,0	0,0303	5,4	0,0285	0,0294	14,0	0,0157	10,7	0,0137	0,0147	50
0,1	14,2	0,0151	10,3	0,0145	0,0148	16,7	0,0081	14,6	0,0069	0,0075	51
0	20,1	—	—	—	—	20,1	—	—	—	—	—

Wie aus dieser Tabelle ersichtlich, ist hier die Ausbeute geringer.

Die Schüttelungsdauer übt selbstverständlich auf die Größe der Ausbeute einen Einfluß aus, wie es aus folgendem Versuch hervorgeht. Es wurden hier ebenfalls 50 ccm der Ausgangslösung und 10 ccm Chloroform in einen 120 ccm großen Schütteltrichter gebracht; eine Lösung wurde im ganzen 10 Minuten und eine andere im ganzen 15 Minuten geschüttelt und filtriert. Die Lösungen wurden in gleicher Weise wie im vorigen Versuch verarbeitet. Die dabei erhaltenen Filtrate

waren weniger gelb und zeigten ebenfalls eine verminderte Trübung nach Sulfosalicylsäurezusatz als diejenige, die im ganzen nur 5 Minuten geschüttelt wurde. Bei beiden Filtraten waren dieselben Unterschiede auch erkennbar (Tabelle VI).

Wie aus diesem Versuch ersichtlich ist, nimmt die Wirksamkeit der Lösung bei längerer Schüttelungszeit immer ab. Nach der Sulfosalicylprobe kann man vermuten, daß gleichzeitig mit der Verminderung der Wirksamkeit auch eine Verminderung des Eiweißes stattfindet. Daraus ergibt sich die Frage, ob nach der Entfernung des Eiweißes der Lösung durch Chloroform auch die Wirksamkeit der Katalase erhalten bleibt. Zur Entfernung des Gesamteiweißes hat *Krüger*, wie ich schon oben mitgeteilt habe, die Hämoglobinlösung mit Chloroformüberschuß zehn- bis zwölfmal am Tage stark geschüttelt.

Bei meinen Versuchen bin ich in folgender Weise vorgegangen. 50 ccm einer gereinigten Lösung werden mit 20 ccm Chloroform in einen Schütteltrichter gebracht und etwa im ganzen 10 Minuten stark geschüttelt, dann zentrifugiert und abfiltriert, es war nur Rückstand in sehr kleiner Menge vorhanden, so daß derselbe leicht übersehen werden konnte. Das Filtrat war wasserklar und wies bei der Sulfosalicylprobe keine Trübung auf.

Tabelle VII.

Unverdünnte Lösung	Ursprüngliche gereinigte Lösung $a-x$ ($t = 20'$)	Wieder geschüttelte Lösung $a-x$ ($t = 20'$)
ccm	ccm	ccm
0,2	8,1	19,3
0,1	12,8	19,7
0	20,2	—

Wie aus diesem Versuch ersichtlich ist, zeigt die Lösung eine sehr starke Abschwächung ihrer Wirksamkeit, wenn sie nach Schütteln

Tabelle VI.

Unverdünnte Lösung	Ausgangslösung					Gereinigte Lösung (10 Minuten geschüttelt)					Ausbeute	Gereinigte Lösung (15 Minuten geschüttelt)					Ausbeute
	$t = 10'$		$t = 20'$		Durchschnittl. K-Werte	$t = 10'$		$t = 20'$		Durchschnittl. K-Werte		$t = 10'$		$t = 20'$		Durchschnittl. K-Werte	
	$a-x$	K	$a-x$	K	K'	$a-x$	K	$a-x$	K	K''	$\frac{K''}{K'}$	$a-x$	K	$a-x$	K	K''	$\frac{K''}{K'}$
ccm	ccm		ccm			ccm		ccm			%	ccm		ccm			%
0,2	10,4	0,0284	5,9	0,0265	0,0275	13,3	0,0177	9,8	0,0155	0,0166	60	14,3	0,0144	10,8	0,0133	0,0139	51
0,1	14,6	0,0137	11,0	0,0130	0,0134	16,3	0,0089	13,9	0,0079	0,0084	63	16,8	0,0074	14,5	0,0069	0,0072	54
0	20,0	—	—	—	—	20,0	—	—	—	—	—	19,9	—	—	—	—	—

mit Chloroform keine Trübungsreaktion mit Sulfosalicylsäure gibt. Es scheint also, daß die Katalasewirkung beim Schütteln mit Chloroform verschwindet, wenn die letzte Spur von Eiweiß auf diesem Wege aus der Lösung entfernt wird.

Die Verhältnisse zwischen den Mengen der Ausgangslösung und des Chloroforms einerseits, andererseits die Verhältnisse zwischen der gesamten Menge der beiden Lösungen und der Größe des Schütteltrichters, die bei meiner Methode angewandt wurden, kann man selbstverständlich auch anders modifizieren. Die Hauptsache bei dieser Methode ist, für jede Blutlösung die passende Schüttelungsdauer zu wählen. Durch Schütteln muß das Eiweiß möglichst entfernt werden und nur ein ganz kleiner Teil davon in der Lösung bleiben. Die passende Schüttelungszeit ist durch den Farbenton der obenstehenden Lösung zu bestimmen. Ich habe das Gemisch so lange geschüttelt, bis die obenstehende Flüssigkeit von dem braunen Farbenton in einen schwach gelben Ton überging. Leider ist der Farbenton wegen des Emulsionszustandes der Lösung schwer zu erkennen, auch bei der Benutzung einer Tüpfelprobe. Daher ist es zweckmäßig, einen kleinen Teil des Gemisches zu zentrifugieren, um aus der obenstehenden Flüssigkeit den Farbenton zu erkennen. Das Hämoglobin fällt tatsächlich in den ersten Minuten zum größten Teil aus und die obenstehende Flüssigkeit zeigt nur eine schwache braune Farbe. Bei dem hier angewandten Pulver wird dieser Zustand nach 2 bis 3 Minuten schon erreicht. Zur weiteren Enteiweißung ist auch möglich, diese braune Lösung vom Niederschlag zu entfernen und weiter mit Chloroform zu schütteln. Es ist zweckmäßig, nunmehr eine kleinere Menge Chloroform und viel kürzere Schüttelungszeit anzuwenden, weil die Katalase sehr leicht in den unlöslichen Zustand übergehen kann.

Die mit Chloroform gereinigte Fermentlösung ist, wie ich schon oben mitgeteilt habe, ganz klar und zeigt nur einen schwach gelben Ton. Aus diesem Aussehen der Lösung kann man mit aller Wahrscheinlichkeit annehmen, daß dieselbe den größten Teil des begleitenden Eiweißes verloren hat. Um sich davon zu überzeugen, habe ich bei den Pulverlösungen und frischem Blut den Stickstoffgehalt und Trockenrückstand der gereinigten Lösung bei einer Temperatur bis 100^0 bestimmt und die Ergebnisse mit denen der Ausgangslösungen verglichen. Ich konnte dabei feststellen, daß die gereinigten Lösungen, im Vergleich zu den Ausgangslösungen, neben der starken Verminderung des Trockenrückstandes viel weniger Stickstoff enthalten.

1. Versuch mit Pulver Nr. 1.

Ich habe bei diesem Versuch das gleiche Pulver benutzt wie bei den vorigen Versuchen. Das Pulver wird 1proz. in destilliertem Wasser

gelöst, zentrifugiert und abfiltriert. Zu 100 ccm von dieser Lösung wurden 20 ccm Chloroform zugesetzt und in einen Schütteltrichter von 240 ccm Inhalt gebracht. Das Gemisch wurde im ganzen 5 Minuten stark geschüttelt. Die obenstehende Flüssigkeit wurde abfiltriert, und dabei wurde eine klare mit leicht gelbem Ton versetzte Flüssigkeit in einer Menge von 95,5 ccm erhalten.

Tabelle VIII.

Unverdünnte Lösung	Ausgangslösung					Gereinigte Lösung					Ausbeute $\frac{K''}{K'}$
	$t = 10'$		$t = 20'$		Durchschnittl. K-Werte K'	$t = 10'$		$t = 20'$		Durchschnittl. K-Werte K''	
ccm	$a - x$ ccm	K	$a - x$ ccm	K		$a - x$ ccm	K	$a - x$ ccm	K		%
0,2	10,2	0,0290	5,7	0,0272	0,0281	12,5	0,0202	8,7	0,0180	0,0191	68
0,1	14,2	0,0147	10,7	0,0135	0,0141	15,8	0,0100	13,3	0,0088	0,0094	67
0	19,9	—	—	—	—	19,9	—	—	—	—	—

	Trockenrückstand (in 100 ccm)	N-Gehalt (in 100 ccm)	N-Gehalt berechnet nach dem Trockenrückstand
Ausgangslösung	0,829 g	127,4 mg	15,4 %
Gereinigte Lösung	0,031 g	2,65 mg	8,5 %
Mengenverhältnisse der gereinigten Lösung gegen Ausgangslösung	3,7 %	2,1 %	—

2. Versuch mit Pulver Nr. 2.

Dieses Pulver wurde nach derselben Methode wie Pulver 1 hergestellt. Von etwa 1000 ccm geschlagenem Pferdeblut wurden die Blutkörperchen abgetrennt und mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen und während einer Nacht mit destilliertem Wasser dialysiert und im *Faust-Heim*schen Apparat getrocknet. Dabei wurden etwa 125 g Pulver erhalten. Das Pulver wurde im Exsikkator weiter getrocknet und im Eisschrank wie Pulver 1 aufbewahrt. Versuche mit diesem Pulver wurden 2 Wochen nach seiner Herstellung vorgenommen. Es löste sich nicht vollständig in Wasser auf wie Pulver 1, doch wurde es filtriert und die erhaltene klare Lösung benutzt. Der Stickstoffgehalt war fast gleich wie beim Pulver 1. Trotzdem war hier die Fällung mit Chloroform schwerer. Durch Schütteln, das in ganz gleicher Weise wie bei Pulver 1 ausgeführt wurde, konnte man die braune Farbe nicht ganz entfernen. Erst bei einer Schüttelungszeit von insgesamt etwa 8 Minuten erhielt man immer eine klare mit schwach gelbem Ton versehene Flüssigkeit.

Diese Pulverlösung war sehr schwer absetzbar, und zwar war nach langem starken Zentrifugieren die obenstehende Lösung immer

noch milchig getrübt; dementsprechend ging die Filtration immer sehr langsam vor sich. Bei Zusatz von einer kleinen Menge von Kochsalz ging die Fällung und Absetzung bedeutend schneller. Aber ich habe immer ohne Kochsalz gearbeitet.

Versuch 1.

100 ccm der 1 proz. Ausgangslösung und 20 ccm Chloroform wurden in einem Schütteltrichter von 240 ccm Inhalt während etwa 40 Minuten mit Unterbrechungen stark geschüttelt und dann zentrifugiert. Dabei betrug die gesamte Schüttelzeit etwa 8 Minuten. Die milchig getrübte obenstehende Lösung wurde filtriert. Das gewonnene Filtrat war klar und hatte nur einen schwachen gelben Ton. Es betrug 94 ccm.

Tabelle IX.

Unverdünnte Lösung	Ausgangslösung					Gereinigte Lösung					Ausbeute
	$t = 10'$		$t = 20'$		Durchschnittl. K-Werte	$t = 10'$		$t = 20'$		Durchschnittl. K-Werte	K''/K'
ccm	$a - x$ ccm	K	$a - x$ ccm	K	K'	$a - x$ ccm	K	$a - x$ ccm	K	K''	%
0,2	8,2	0,0385	3,8	0,0360	0,0373	9,1	0,0340	4,8	0,0309	0,0325	87
0,1	12,8	0,0192	8,8	0,0177	0,0185	13,3	0,0175	9,9	0,0152	0,0164	89
0	19,9	—	—	—	—	19,9	—	—	—	—	—

	Trockenrückstand (in 100 ccm)	N-Gehalt (in 100 ccm)	N-Gehalt berechnet nach dem Trockenrückstand
Ausgangslösung	0,828 g	128,8 mg	15,6 %
Gereinigte Lösung	0,028 g	2,45 mg	8,8 %
Mengenverhältnisse der gereinigten Lösung gegen Ausgangslösung	3,4 %	1,9 %	—

Versuch 2.

Dieser Versuch wurde ganz genau wie Versuch 1 ausgeführt, dabei betrug die erhaltene klare und mit schwach gelbem Ton versehene Lösung 95 ccm.

Tabelle X.

Unverdünnte Lösung	Ausgangslösung					Gereinigte Lösung					Ausbeute
	$t = 10'$		$t = 20'$		Durchschnittl. K-Werte	$t = 10'$		$t = 20'$		Durchschnittl. K-Werte	K''/K'
ccm	$a - x$ ccm	K	$a - x$ ccm	K	K'	$a - x$ ccm	K	$- x$ ccm	K	K''	%
0,2	8,7	0,0357	4,3	0,0332	0,0345	10,1	0,0292	5,8	0,0267	0,0280	81
0,1	12,9	0,0186	9,4	0,0162	0,0174	14,2	0,0144	10,8	0,0132	0,0138	79
0	19,8	—	—	—	—	19,8	—	—	—	—	—

	Trockenrückstand (in 100 ccm)	N-Gehalt (in 100 ccm)	N-Gehalt berechnet nach dem Trockenrückstand
Ausgangslösung	0,827 g	130,6 mg	15,8 %
Gereinigte Lösung	0,028 g	2,24 mg	8,0 %
Mengenverhältnisse der gereinigten Lösung gegen Ausgangslösung	3,4 %	1,7 %	—

Wie aus diesen Beispielen zu ersehen ist, haben die gereinigten Lösungen unter denselben Arbeitsbedingungen ungefähr 80 % Wirksamkeit behalten. Dagegen pflegten der Trockenrückstand unter $^1/_{25}$ und der Stickstoffgehalt unter $^1/_{50}$ der Ausgangslösung zu sinken.

3. Versuch mit frischen Blutkörperchen.

Als frische Blutkörperchen habe ich die der Kaninchen benutzt. Dieselben waren hier nicht dialysiert.

Versuch 1.

15 ccm frisch geschlagenen Bluts wurden vom Serum abgetrennt. Die Blutkörperchen wurden dreimal mit physiologischen Kochsalzösungen gewaschen, dann von der Waschflüssigkeit abgetrennt und mit destilliertem Wasser bis auf 150 ccm aufgefüllt (10 %). Die in dieser Weise hergestellte Blutlösung wurde filtriert und sofort benutzt. Die Wirksamkeit der Ausgangslösung wurde dann sofort untersucht. Gleichzeitig wurden 100 ccm dieser Ausgangslösung und 20 ccm Chloroform in einen Schütteltrichter von 240 ccm Inhalt gebracht und im ganzen etwa 10 Minuten mit Unterbrechungen stark geschüttelt (eine gesamte Schüttelungsdauer von 5 Minuten war hier ungenügend). Das Gemisch wurde zentrifugiert und die obenstehende Flüssigkeit wurde filtriert. Das Filtrat betrug 93 ccm. Es war ganz klar und hatte nur einen ganz schwach gelben Ton.

Wie aus dieser Tabelle zu ersehen ist, vermindern sich hier ebenfalls bei frischem Blut unter der Einwirkung des Chloroforms der Trockenrückstand und der Stickstoffgehalt sehr stark, ohne seine Wirksamkeit erheblich einzubüßen. Den verhältnismäßigen Mehrgehalt des Trockenrückstandes der gereinigten Lösung, im Vergleich zu der aus Pulver hergestellten gereinigten Lösung, kann man vielleicht zum Teil dadurch erklären, daß hier bei dieser Blutlösung die enthaltenen Salze durch Dialyse nicht entfernt worden sind.

Ich habe hier ebenfalls die Wirksamkeit des durch Chloroform aufgetretenen Niederschlages und auch die der Substanzen, die dabei in Chloroform übergegangen sind, geprüft.

Tabelle XI.

Unverdünnte Lösung	Ausgangslösung					Gereinigte Lösung					Ausbeute $\frac{K''}{K'}$
	$t = 10'$		$t = 20'$		Durchschnittl. K-Werte	$t = 10'$		$t = 20'$		Durchschnittl. K-Werte	
ccm	$a - x$ ccm	K	$a - x$ ccm	K	K'	$a - x$ ccm	K	$a - x$ ccm	K	K''	%
0,05	7,7	0,0376	3,4	0,0366	0,0371	8,9	0,0313	4,7	0,0295	0,0304	82
0,025	11,9	0,0187	8,1	0,0177	0,0182	12,7	0,0159	9,3	0,0147	0,0153	84
0	18,3	—	—	—	—	18,3	—	—	—	—	—

	Trockenrückstand (in 100 ccm)	N-Gehalt (in 100 ccm)	N-Gehalt berechnet nach dem Trockenrückstand
Ausgangslösung	1,092 g	158,2 mg	14,5 %
Gereinigte Lösung	0,065 g	3,26 mg	5,0 %
Mengenverhältnisse der gereinigten Lösung gegen Ausgangslösung	6,0 %	2,1 %	—

Der Niederschlag wurde vom Chloroform möglichst befreit und mit destilliertem Wasser bis zum ursprünglichen Volumen ersetzt. Der Niederschlag war anscheinend im Wasser fast unlöslich. Diese Lösung hatte noch Chloroformgeruch.

Tabelle XII.

Unverdünnte Lösung	$t = 10'$		$t = 20'$	
ccm	$a - x$ ccm	K	$a - x$ ccm	K
0,05	17,1	0,0032	16,3	0,0026
0,025	17,6	0,0019	17,3	0,0013
0	18,4	—	—	—

Zum Prüfen der Wirksamkeit der in Chloroform übergegangenen Substanzen wurden 10 ccm Chloroform zuerst im *Faust-Heim*schen Apparat und dann im Exsikkator getrocknet. Der weiße Trockenrückstand wog etwa 0,003 g. Er wurde in 10 ccm destilliertem Wasser verteilt.

Tabelle XIII.

Unverdünnte Lösung ccm	$a - x$ $(t = 20')$ ccm
2,0	20,0
1,0	20,0
0	20,0

Wie aus den Tabellen hervorgeht, wirkt der Niederschlag sehr wenig, und die in Chloroform übergegangenen Substanzen gar nicht.

Ob die Katalase auch bei hämolytischen Blutkörperchen durch das Chloroform aktiviert wird, kann ich nicht mit Sicherheit sagen. Aber man kann hier wenigstens beobachten, daß eine deutliche Schädigung seitens Chloroform ausbleibt.

Versuch 2.

Aus 15 ccm frisch geschlagenem Blut wurde die gereinigte Lösung in gleicher Weise wie bei dem vorigen Versuch hergestellt, nur mit einem Unterschied, daß hier 100 ccm Ausgangslösung (10% hämolytische Blutkörperchenlösung) und 20 ccm Chloroform im Schütteltrichter von etwa 660 ccm Inhalt anstatt 240 ccm Inhalt gebracht und im ganzen etwa 6 Minuten anstatt etwa 10 Minuten stark geschüttelt wurden. Die erhaltene gereinigte Lösung war auch ganz klar und hatte nur einen ganz schwach gelben Ton. Sie betrug 92 ccm.

Tabelle XIV.

Unverdünnte Lösung	Ausgangslösung					Gereinigte Lösung					Ausbeute
	$t = 10'$		$t = 20'$		Durchschnittl. K-Werte	$t = 10'$		$t = 20'$		Durchschnittl. K-Werte	$\frac{K''}{K'}$
ccm	$a - x$ ccm	K	$a - x$ ccm	K	K'	$a - x$ ccm	K	$a - x$ ccm	K	K''	%
0,05	9,6	0,0310	5,2	0,0288	0,0299	11,0	0,0251	6,3	0,0247	0,0249	83
0,025	13,6	0,0159	10,1	0,0144	0,0152	14,7	0,0125	11,5	0,0116	0,0121	80
0	19,6	—	—	—	—	19,6	—	—	—	—	—

	Trockenrückstand (in 100 ccm)	N-Gehalt (in 100 ccm)	N-Gehalt berechnet nach dem Trockenrückstand
Ausgangslösung	1,103 g	162,4 mg	14,7 %
Gereinigte Lösung	0,065 g	2,66 mg	4,1 %
Mengenverhältnisse der gereinigten Lösung gegen Ausgangslösung	5,9 %	1,6 %	—

Versuch 3.

Bei diesem Versuch wurde alles in ganz gleicher Weise wie bei dem Versuch 2 ausgeführt. Dieselbe Menge einer 10proz. hämolytischen Blutkörperchenlösung und des Chloroforms wurde in einen Schütteltrichter von derselben Größe gebracht. Durch ungefähr gleiche Schüttelungszeit wurde eine genau gleich gereinigte Lösung in einer Menge von 93 ccm erhalten.

Tabelle XV.

Unverdünnte Lösung	Ausgangslösung					Gereinigte Lösung					Ausbeute $\frac{K''}{K'}$
	$t = 10'$		$t = 20'$		Durchschnittl. K-Werte	$t = 10'$		$t = 20'$		Durchschnittl. K-Werte	
ccm	$a - x$ ccm	K	$a - x$ ccm	K	K'	$a - x$ ccm	K	$a - x$ ccm	K	K''	%
0,05	6,2	0,0511	2,3	0,0471	0,0491	6,9	0,0462	2,9	0,0419	0,0441	90
0,025	11,1	0,0258	6,6	0,0242	0,0250	11,9	0,0226	7,6	0,0210	0,0218	87
0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

	Trockenrückstand (in 100 ccm)	N-Gehalt (in 100 ccm)	N-Gehalt berechnet nach dem Trockenrückstand
Ausgangslösung	—	172,2 mg	—
Gereinigte Lösung	0,066 g	3,45 mg	5,2 %
Mengenverhältnisse der gereinigten Lösung gegen Ausgangslösung	—	2,0 %	—

Wie aus diesen Beispielen ersichtlich ist, kann man unter denselben Bedingungen immer fast gleiche gute Resultate bekommen. Hier hat die Fällung und Absetzung leicht stattgefunden. Freilich ist der besonders gute Ausfall des Versuchs 3 (Tabelle XV) nur als Ausnahme anzusehen.

2. Die Adsorption mit dreibasischem Calciumphosphat.

Die Adsorptionsmethode gehört zu den ältesten Verfahren, welche man zur Isolierung von Enzymen angewandt hat. Durch die Untersuchungen *Willstätters* und seiner Mitarbeiter ist diese Methode wieder in den Vordergrund der Enzymforschung gerückt und das praktische Handeln auf eine sichere theoretische Grundlage gestellt worden.

Was die Blutkatalase angeht, so hat *Madinaveitia*[1]) im Laboratorium *Willstätters* die Adsorptionsfähigkeit von Kaolin, Talk, Blutkohle, Calciumcarbonat und Tristearin untersucht. Nach seinen Angaben war das Resultat kein befriedigendes, die angewandten Adsorptionsstoffe, wenn sie selektiv adsorbierten, zeigten eine größere Affinität zur Katalase als zu deren Begleitstoffen. Er bemühte sich bei der Tristearinadsorption, aus der Adsorptionsverbindung des Ferments mit dem Fett, nach Herauslösen des letzteren durch organische Lösungsmittel, die Katalase in reiner Form als Rückstand zu erhalten, aber das Resultat war negativ, weil beim Herauslösen des Fettes die Katalase in einer wasserunlöslichen und wenig wirksamen Form zurückblieb.

[1]) *Madinaveitia*, Dissertation Zürich 1912.

Ich habe mit dem dreibasischen Calciumphosphat versucht, die Blutkatalase zu reinigen. Zunächst hatte ich in der Literatur keine Angaben über die Adsorption des Calciumphosphats bei den Katalasen gefunden. Dagegen war die Verwendung desselben bei den anderen Fermenten bekannt. So berichtet *Brücke*[1]), daß er das Pepsin mit $(PO_4)_2Ca_3$ gereinigt hat. *Jacoby* und *Shimizu*[2]) konnten die Soja-Urease durch das frisch bereitete Calciumphosphat adsorbieren. *Willstätter* und *Racke*[3]) haben nachgewiesen, daß Invertin von $(PO_4)_2Ca_3$ adsorbiert wird und durch Umwandlung des Niederschlages in sekundäres Phosphat eluiert wird.

Nach Abschluß meiner Untersuchungen habe ich gefunden, daß *Ville* und *Moitessier*[4]) bereits im Jahre 1903 durch Calciumphosphat die Katalase aus Blut niedergeschlagen haben. *Ville* und *Moitessier* haben berichtet, daß sie mit Pferdeblut nicht gute Resultate erhalten haben. Da ich die Arbeit der Autoren nicht gekannt habe, habe ich hauptsächlich mit Pferdeblut gearbeitet. Ich fand, daß man mit $(PO_4)_2Ca_3$ die Katalase ganz gut aus Pferdeblut adsorbieren und mit Na_2HPO_4 aus dem Niederschlag eluieren kann. Da aber auch Hämoglobin adsorbiert wird, ist die Trennung der Katalase vom Hämoglobin auf diesem Wege nur möglich, wenn man, wie ich es getan habe, die besten Bedingungen der Adsorption und Elution ermittelt.

Experimentelles.

Für diese Versuche habe ich frisch gefälltes dreibasisches Calciumphosphat benutzt, welches in folgender Weise hergestellt wurde:

7,6 g Na_3PO_4 12 H_2O und 6,57 g $CaCl_2$ 6 H_2O wurden in je 100 ccm destillierten Wassers gelöst und die beiden so hergestellten Lösungen zusammengebracht. Der dabei entstandene Niederschlag wurde, um das Kochsalz zu entfernen, mit destilliertem Wasser versetzt und gut umgerührt. Nach dem Absetzen der Fällung wurde das obenstehende Wasser abgesaugt. In solcher Weise wurde so lange vorgegangen, bis Salpetersäure und Silbernitrat in der obenstehenden Lösung keine Trübung mehr hervorrufen. Dann wurde der Niederschlag durch einmaliges Zentrifugieren vom Wasser abgetrennt und wiederum mit destilliertem Wasser bis auf 150 ccm versetzt. Die in solcher Weise hergestellte Suspension wurde in einer fest verschlossenen

---

[1]) Vorlesungen über Physiologie 1, 1881.

[2]) *Jacoby* und *Shimizu*, diese Zeitschr. 128, 1922.

[3]) *Willstätter* und *Racke*, Justus Liebigs Ann. 425, 1920.

[4]) Diese Verfasser (Bull. de la soc. chim. de Paris 29, 1903) konnten so auch die Katalase vom Hämoglobin bis zu einem gewissen Grade trennen. Quantitative Einzelheiten fehlen in der kurzen Mitteilung. Das Enzym ist aus dem Niederschlag mit Wasser nicht extrahierbar, wohl aber durch Natriumcarbonat, Ammoniumcarbonat und Na_2HPO_4 extrahierbar. *Gessard* (C. r. 148, 1909) hatte die Katalase dem $(PO_4)_2Ca_3$-Niederschlag durch inaktiviertes Blutserum entzogen.

Flasche im Eisschrank aufbewahrt. Gewöhnlich wurde alle drei Wochen in gleicher Weise eine neue Suspension frisch hergestellt.

Meine ersten Versuche gingen dahin, festzustellen, ob die Suspension fähig ist, die Katalase aus der Blutlösung zu adsorbieren. In diesen Versuchen wurden die Blutlösungen, die aus Pulver 2 hergestellt wurden, benutzt. Über das Pulver 2 ist Genaueres im vorigen Abschnitt gebracht worden.

Eine 0,5proz. wässerige Pulverlösung wurde zentrifugiert und filtriert und das gewonnene klare Filtrat für die Versuche benutzt.

10 ccm $(PO_4)_2Ca_3$-Suspension wurde zentrifugiert und das Wasser dekantiert. Zu dem erhaltenen Niederschlag im Zentrifugierglas wurden 10 ccm der filtrierten Pulverlösung zugesetzt und mit einem Glasstab ordentlich durchgemischt. Unter öfterem Umrühren wurde diese Mischung 10 Minuten lang bei Zimmertemperatur stehen gelassen, dann stark zentrifugiert und die oben stehende Flüssigkeit abfiltriert. 2 ccm des erhaltenen Filtrats wurde mit m/150 neutralem Phosphatgemisch bis auf 50 ccm aufgefüllt. Der Niederschlag wurde mit destilliertem Wasser bis auf 10 ccm aufgefüllt und 2 ccm davon wiederum mit m/150 neutralem Phosphatgemisch bis auf 50 ccm aufgefüllt. Als Kontrolle wurden 2 ccm der Pulverlösung mit m/150 neutralem Phosphatgemisch bis auf 50 ccm aufgefüllt. Das hier gebrauchte Phosphatgemisch wurde in gleicher Weise wie in den früheren Versuchen vorher bis auf 2°C abgekühlt.

Tabelle XVI.

Verdünnte Lösung	Pulverlösung		$(PO_4)_2Ca_3$ Abguß	$(PO_4)_2Ca_3$ Niederschlag	
	$a - x$ ($t = 10'$)	$a - x$ ($t = 20'$)	$a - x$ ($t = 20'$)	$a - x$ ($t = 10'$)	$a - x$ ($t = 20'$)
ccm	ccm	ccm	ccm	ccm	ccm
10	7,8	3,6	19,6	8,8	4,5
5	12,5	8,5	19,5	13,3	9,4
0	19,5	—	19,5	—	—

Wie aus dieser Tabelle ersichtlich ist, wird die Katalase durch eine genügende Menge von $(PO_4)_2Ca_3$-Suspension fast quantitativ adsorbiert. Der dabei erhaltene Niederschlag war dunkelbraun verfärbt. Das Filtrat war wasserklar und wies keine braune Farbe auf. Daraus läßt sich entnehmen, daß auch das Hämoglobin in den Niederschlag übergegangen ist.

Die adsorbierte Katalase und das Hämoglobin können dem Adsorbens nicht mehr durch Wasser entzogen werden. Die Versuche, diese beiden Substanzen voneinander zu trennen, sind auf diesem Wege nicht gelungen. Aber bei Anwendung von passenden Mengen von Pulverlösung und $(PO_4)_2Ca_3$-Suspension kann die Katalase vom Hämo-

globin bis zu einem gewissen Grade getrennt werden, wie aus der nächsten Tabelle hervorgeht. 01 ccm, 5 ccm und 2,5 ccm $(PO_4)_2Ca_3$-Suspension wurden zentrifugiert und das Wasser dekantiert. Zu den erhaltenen Niederschlägen wurden je 20 ccm einer 1 proz. Pulverlösung zugesetzt. Also für 10 ccm 1 proz. Pulverlösung wurden 5 ccm, 2,5 ccm und 1,25 ccm Suspension angewandt. Nach 10 Minuten wurden die Mischungen zentrifugiert und abfiltriert. 1 ccm der Abgüsse und der Pulverlösung (als Kontrolle) wurden in gleicher Weise wie bei dem vorigen Versuch mit m/150 neutralem Phosphatgemisch bis auf 50 ccm aufgefüllt. Die Niederschläge wurden mit destilliertem Wasser auf 10 ccm und 1 ccm davon mit demselben Phosphatgemisch auf 50 ccm wiederum aufgefüllt. Der Hämoglobingehalt der Abgüsse wurde kolorimetrisch mit Hilfe eines Komparators mit der mit destilliertem Wasser verdünnten Pulverlösung verglichen. Die Standardpulverlösung war im wesentlichen klar, aber durch Verdünnung mit destilliertem Wasser trat eine schwache Trübung ein. Die Abgüsse waren dagegen ganz klar. Demgemäß waren hier die erhaltenen Vergleichungswerte nicht als ganz exakt zu betrachten. In diesem Versuch wurde der Stickstoffgehalt der gleichen Abgüsse mit den kolorimetrischen Werten des Hämoglobins verglichen.

Wie aus diesem Versuch deutlich zu ersehen ist, spielen die Mengenverhältnisse der Pulverlösung und der $(PO_4)_2Ca_3$-Suspension zur

Tabelle XVII.

$t = 20$ Minuten.

Verdünnte Lösung	1 proz. Pulverlösung		20 ccm 1 proz. Pulverlösung + 10 ccm $(PO_4)_2Ca_3$				20 ccm 1 proz. Pulverlösung + 5 ccm $(PO_4)_2Ca_3$				20 ccm 1 proz. Pulverlösung + 2,5 ccm $(PO_4)_2Ca_3$			
			Abguß		Niederschlag		Abguß		Niederschlag		Abguß		Niederschlag	
ccm	$a-x$ ccm	K	$a-x$ ccm	K	$a-x$ ccm	K	$a-x$ ccm	K	$a-x$ ccm	K	$a-x$ ccm	K	$a-x$ ccm	K
10	3,9	0,0353	19,7	—	4,8	0,0308	19,0	0,0009	5,1	0,0295	14,0	0,0075	6,7	0,0235
5	8,9	0,0174	19,8	—	9,9	0,0151	19,4	0,0004	10,2	0,0144	16,6	0,0039	11,8	0,0112
0	19,8	—	19,8	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Hb.	100 %	—	etwa 25 %	—	—	—	50—45 %	—	—	—	70—65 %	—	—	—
N-Gehalt unverdünnter Lösung in 100 ccm	128,8 mg	—	33,6 mg (26 %)	—	—	—	67,2 mg (52 %)	—	—	—	93,8 mg (73 %)	—	—	—

Trennung der Katalase vom Hämoglobin eine wichtige Rolle. So wird z. B. bei 5 ccm $(PO_4)_2Ca_3$-Suspension fast die gesamte Katalase adsorbiert, während ungefähr die Hälfte des Hämoglobins im Abgusse zurückbleibt. Die vollständig adsorbierte Katalase und das vollständig adsorbierte Hämoglobin können, wie oben mitgeteilt wurde, durch Wasser dem Adsorbens nicht mehr entzogen werden, d. h. wenn das Hämoglobin im Abguß noch zurückbleibt, aber keine Katalase, so kann nur das Hämoglobin durch Wasser zum Teil entzogen werden, z. B. wie bei 10 ccm $(PO_4)_2Ca_3$-Suspension. Wenn die Katalase und das Hämoglobin sich gleichzeitig im Abgusse finden, so ist es möglich, die beiden Substanzen teilweise durch Wasser zu entfernen, z. B. wie bei 2,5 ccm $(PO_4)_2Ca_3$-Suspension. Aber eine bestimmte Menge der beiden Substanzen ist mit einer bestimmten Menge von $(PO_4)_2Ca_3$ immer gegen Wasser fest verbunden. Diese Tatsache ist z. B. aus dem nächsten Versuch deutlich zu ersehen.

1,3 ccm $(PO_4)_2Ca_3$-Suspension wurde zentrifugiert und das Wasser dekantiert. Der Niederschlag wurde mit 10 ccm einer 1 proz. Pulverlösung versetzt, und nach Ablauf von 10 Minuten wurde das Gemisch zentrifugiert und abfiltriert (Abguß I). Der Niederschlag wurde wiederholt in gleicher Weise dreimal mit 10 ccm destillierten Wassers gut gemischt und jedesmal zentrifugiert und abfiltriert (Abguß II, III und IV). 1 ccm dieser Abgüsse wurde mit neutralem Phosphatgemisch bis auf 50 ccm aufgefüllt. Der letzte Niederschlag wurde mit Wasser bis auf 10 ccm, und 1 ccm davon wiederum mit neutralem Phosphatgemisch bis auf 50 ccm aufgefüllt (Niederschlag).

Tabelle XVIII.

Verdünnte Lösung	$a - x$ ($t = 20'$)				
	Abguß I	Abguß II	Abguß III	Abguß IV	Niederschlag
ccm	ccm	ccm	ccm	ccm	ccm
10	14,2	19,8	20,1	20,2	7,3
5	17,1	20,0	20,2	—	12,3
0	20,2	—	—	—	—
Hb.	etwa 70%	etwa 5%	etwa 3%	—	—

Wie ersichtlich ist, wird ein Teil der Katalase und des Hämoglobins von Wasser dem Niederschlag entzogen, aber ein gewisser Teil der beiden Substanzen ist gegen Wasser fest mit $(PO_4)_2Ca_3$ verbunden.

Dieser Adsorptionsvorgang muß abhängig sein von verschiedenen komplizierten Bedingungen. Die Größe der Oberfläche der Adsorptionsmittel spielt bekanntlich eine wichtige Rolle. So habe ich früher, um aus dem frisch gefällten $(PO_4)_2Ca_3$ das Kochsalz zu entfernen, den Niederschlag in Zentrifugiergläser verteilt, über 15 mal mit Wasser

gewaschen und jedesmal zentrifugiert. Durch solche Behandlungsweise wird der Niederschlag anscheinend immer kleiner. Dieser Niederschlag besitzt eine bedeutend kleinere Adsorptionsfähigkeit als derjenige Niederschlag, aus welchem, ohne Zentrifugieren, nur durch Stehenlassen mit Wasser und Dekantieren der oben stehenden Lösung das Kochsalz entfernt wird.

Die Mischungstechnik, durch welche $(PO_4)_2Ca_3$ und Fermentlösung in Kontakt kommen, beeinflußt natürlich auch die Adsorptionsmenge. Ich brachte zunächst die Calciumphosphatsuspension in Zentrifugiergläser, entfernte durch Zentrifugieren und Dekantieren das oben stehende Wasser, fügte dann die Fermentlösung hinzu und rührte sofort gründlich durch und wiederholte das öfters. Ich hatte den Eindruck, daß diese Art des Vorgehens für den Erfolg der Adsorption von Bedeutung ist.

Als Fermentlösung habe ich immer die stark zentrifugierte und abfiltrierte klare Lösung für die Versuche benutzt. Denn bei einer trüben Lösung könnte der Adsorptionsvorgang anders ausfallen.

Als Kontaktdauer habe ich immer die Zeit von 10 Minuten benutzt. Tatsächlich zeigt diese Kontaktdauer im Vergleich zu der 24stündigen keine merkbaren Unterschiede für die adsorbierte Katalasenmenge, wie man aus dem folgenden Versuch ersehen kann.

1,3 ccm $(PO_4)_2Ca_3$-Suspension wurde zentrifugiert und das Wasser dekantiert. Der Niederschlag wurde mit 10 ccm 1proz. Pulverlösung versetzt. Ein solches Gemisch wurde nach 10 Minuten und ein gleiches nach 24stündigem Aufbewahren im Eisschrank zentrifugiert und abfiltriert.

Abgüsse: 1 ccm mit neutralem Phosphatgemisch bis auf 50 ccm.

Niederschläge: mit Wasser bis auf 10 ccm, 1 ccm davon mit neutralem Phosphatgemisch wiederum bis auf 50 ccm.

Tabelle XIX.

Verdünnte Lösung	Nach 10 Minuten $a-x$ ($t = 20'$)		Nach 24 Stunden $a-x$ ($t = 20'$)	
	Abguß	Niederschlag	Abguß	Niederschlag
ccm	ccm	ccm	ccm	ccm
10	14,0	6,9	16,0	6,6
5	16,8	11,8	17,7	11,5
0	19,8	—	19,7	—

Der Hämoglobingehalt des Abgusses nach 24stündigem Kontakt scheint etwas geringer als nach 10 Minuten Kontakt zu sein. Aber der Unterschied war nicht so deutlich, daß man es mit aller Sicherheit

nachweisen konnte. Die Mengen der adsorbierten Katalase sind, wie aus der Tabelle ersichtlich ist, fast gleich.

Weiter habe ich die Beeinflussung der Temperatur auf die Adsorption untersucht.

4 ccm $(PO_4)_2Ca_3$-Suspension (diese Suspension war durch mehrmaliges Zentrifugieren vom Kochsalz befreit) wurde mit destilliertem Wasser auf 20 ccm aufgefüllt. Je 5 ccm dieser Suspension und je 10 ccm 0,5 proz. Pulverlösung wurden im Brutofen, bei Zimmertemperatur und im schmelzenden Eis so lange stehen gelassen, bis dieselbe eine Temperatur von 30° C, 20° C, und 2° C angenommen hatten. Dann wurden diese Suspensionen und Pulverlösungen gemischt und nochmals bei den betreffenden Temperaturen 10 Minuten lang stehen gelassen. Nach Ablauf dieser Zeit wurden sie gleichzeitig zentrifugiert und abfiltriert.

Abgüsse: 2 ccm mit neutralem Phosphatgemisch bis auf 50 ccm.

Niederschläge: mit destilliertem Wasser bis auf 10 ccm, 2 ccm davon mit neutralem Phosphatgemisch wiederum bis auf 50 ccm.

Tabelle XX.

Verdünnte Lösung	30° C		20° C		2° C	
	$a - x$ ($t = 20'$)					
	Abguß	Niederschlag	Abguß	Niederschlag	Abguß	Niederschlag
ccm	ccm	ccm	ccm	ccm	ccm	ccm
10	15,8	8,5	15,4	8,7	14,5	8,9
5	17,2	12,8	17,0	13,0	16,6	13,0
0	19,0	—	—	—	—	—

Der Hämoglobingehalt der Abgüsse zeigte keinen merkbaren Unterschied. Die adsorbierte Katalasemenge scheint mit der steigenden Temperatur sich zu vergrößern. Aber der Unterschied ist sehr unbedeutend.

In den weiteren Versuchen ist der Einfluß des Kochsalzes auf die Adsorption untersucht worden.

So wurden 4,0 ccm $(PO_4)_2Ca_3$-Suspension mit destilliertem Wasser bis auf 20 ccm aufgefüllt. Je 5 ccm derselben wurden 1. mit 0,75 g, 2. mit 0,15 g und 3. mit 0 g NaCl versetzt. Dazu kamen je 10 ccm einer 1 proz. Pulverlösung[1]), also betrug der prozentuale Kochsalzgehalt ungefähr bei 1. 5 %, bei 2. 1 % und bei 3. 0 %. Nach 10 Minuten wurden die Gemische gleichzeitig zentrifugiert und filtriert.

Abgüsse: 1 ccm davon mit neutralem Phosphatgemisch bis auf 50 ccm.

Niederschläge: mit destilliertem Wasser bis auf 10 ccm, 1 ccm davon mit neutralem Phosphatgemisch wiederum bis auf 50 ccm.

---

[1]) Das Pulver, welches hier angewandt wird, ist, wie im Abschnitt 1 genau beschrieben worden, aus Pferdeblutkörperchen durch 24 stündige Dialyse hergestellt. Demgemäß ist das Pulver salzärmer im Vergleich zu frischen Blutlösungen.

Tabelle XXI.

Verdünnte Lösung	1. 5% NaCl		2. 1% NaCl		3. ohne NaCl	
	$a-x$ $(t=20')$					
	Abguß	Niederschlag	Abguß	Niederschlag	Abguß	Niederschlag
ccm	ccm	ccm	ccm	ccm	ccm	ccm
10	10,5	12,3	10,7	11,4	11,3	10,3
5	13,9	15,3	14,3	14,6	14,5	13,7
0	18,4	—	—	—	—	—

Wie aus der Tabelle ersichtlich ist, befindet sich weniger Katalase in den Niederschlägen mit steigender Menge von NaCl und in den Abgüssen ungefähr gleiche Mengen derselben. Der Hämoglobingehalt war bei dem 5 % NaCl enthaltenden Abguß etwas mehr als bei dem NaCl-freien Abguß. Wie bekannt, schädigt das Kochsalz die Katalase; daher ist es unmöglich, sichere Resultate zu erhalten. Aber aus der Tatsache, daß trotz der schädigenden Wirkung des Kochsalzes die Wirksamkeit der Katalase in allen Abgüssen ungefähr gleich ist, kann man wahrscheinlich vermuten, daß die Adsorption durch das Kochsalz erschwert wird. Als Ursache der Verminderung der adsorbierten Katalasemenge bei Gegenwart von NaCl kann vielleicht zum Teil vermehrte Löslichkeit von $(PO_4)_2Ca_3$ in der Salzlösung angenommen werden.

Endlich habe ich einen Versuch angestellt, um den Einfluß einer alkalischen Reaktion auf die Adsorption zu beobachten.

5 ccm $(PO_4)_2Ca_3$-Suspension wurden zentrifugiert und das Wasser dekantiert. Der Niederschlag wurde bei 1. mit 5 ccm m/15 Na_2HPO_4, bei 2. mit 5 ccm m/30 Na_2HPO_4 und bei 3. mit 5 ccm destillierten Wassers versetzt. Dazu kamen je 10 ccm 1 proz. Pulverlösung. Nach 10 Minuten wurden die Gemische zentrifugiert und abfiltriert.

Abgüsse: bei 1. und 2. 10 ccm Abguß wurden mit m/15 KH_2PO_4 neutralisiert und mit destilliertem Wasser bis auf 20 ccm aufgefüllt; 2 ccm davon wurden wiederum mit neutralem Phosphatgemisch bis auf 50 ccm aufgefüllt; bei 3. 1 ccm Abguß mit neutralem Phosphatgemisch bis auf 50 ccm.

Niederschläge: mit destilliertem Wasser bis auf 10 ccm, 1 ccm davon mit neutralem Phosphatgemisch bis auf 50 ccm.

Tabelle XXII.

Verdünnte Lösung	1. m/15 Na_2HPO_4		2. m/30 Na_2HPO_4		3. H_2O	
	$a-x$ $(t=20')$					
	Abguß	Niederschlag	Abguß	Niederschlag	Abguß	Niederschlag
ccm	ccm	ccm	ccm	ccm	ccm	ccm
10	9,0	14,3	10,3	12,4	19,5	4,6
5	13,7	16,7	14,3	15,5	—	9,7
0	19,6	—	—	—	—	—
Hb.	dunkler braun als andere Abgüsse				heller als andere Abgüsse	

Wie aus dieser Tabelle ersichtlich ist, vermindert sich sehr stark die adsorbierte Menge der Katalase und des Hämoglobins bei Gegenwart von zweibasischem Natriumphosphat.

Ich habe schon oben einige Beobachtungen über den Adsorptionsvorgang gemacht. Weitere Versuche bezwecken das Eluieren der Katalase aus dem Adsorbat.

Die durch $(PO_4)_2Ca_3$ vollständig adsorbierte Katalase kann, wie oben mitgeteilt wurde, durch Wasser nicht mehr extrahiert werden. Zum Zwecke der Elution habe ich die verschiedenen Konzentrationen von Ammoniak, Natrium carbonicum, Natrium bicarbonicum, zweibasisches Natriumphosphat und einbasisches Kaliumphosphat benutzt. Unter denselben zeigte sich das zweibasische Natriumphosphat als das beste Eluens. Natrium carbonicum und und Natrium bicarbonicum standen in zweiter Linie. Ammoniak machte nur ein wenig frei. Einbasisches Kaliumphosphat konnte auch etwas frei machen. Schon mit einer sehr verdünnten Na_2HPO_4-Lösung kann das Eluieren ausgezeichnet stattfinden, wie man es aus dem nächsten Versuche ersehen kann.

5 ccm einer $(PO_4)_2Ca_3$-Suspension wurde zentrifugiert und das Wasser dekantiert. Der Niederschlag wurde mit 20 ccm 1 proz. Pulverlösung versetzt. Nach 10 Minuten wurde das Gemisch zentrifugiert und abfiltriert. Der Niederschlag wurde dreimal mit 20 ccm destillierten Waasers gewaschen und von demselben abgetrennt. Dann wurde dieser Niederschlag mit 20 ccm m/150 Na_2HPO_4 versetzt und unter öfterem Umrühren 15 Minuten lang bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Danach wurde das Gemisch zentrifugiert und filtriert (Elution 1). Der Niederschlag wurde abermals mit 20 ccm m/150 Na_2HPO_4 in gleicher Weise behandelt (Elution 2).

Elutionen: 10 ccm davon wurden mit m/15 KH_2PO_4 neutralisiert und mit destilliertem Wasser bis auf 20 ccm aufgefüllt und 2 ccm dieser Lösung mit neutralem Phosphatgemisch bis auf 50 ccm wiederum aufgefüllt.

Niederschlag: der letzte Niederschlag mit destilliertem Wasser bis auf 10 ccm, 1 ccm davon mit neutralem Phosphatgemisch wiederum bis auf 50 ccm.

Pulverlösung: 1 ccm davon mit neutralem Phosphatgemisch bis auf 50 ccm.

Der Hämoglobingehalt wurde kolorimetrisch verglichen; bei der Elution wurde die Standardpulverlösung mit der gleichen konzentrierten Na_2HPO_4-Lösung verdünnt.

Tabelle XXIII. $t = 20$ Minuten.

Verdünnte Lösung	Pulverlösung		$(PO_4)_2Ca_3$						
			Elution I		$\frac{K}{K'}$	Elution II		Niederschlag	
	$a - x$	K'	$a - x$	K		$a - x$	K	$a - x$	K
ccm	ccm		ccm		%	ccm		ccm	
10	4,5	0,0325	8,8	0,0179	55	17,5	0,0030	16,9	0,0038
5	9,4	0,0165	13,6	0,0085	52	18,8	0,0015	18,4	0,0019
0	20,1	—	20,1	—	—	—	—	—	—
Hb.	100%		etwa 20%			etwa 5%			

Wie aus dieser Tabelle ersichtlich ist, geht die Katalase in Elution I über in einer Menge von etwa 54 % der originalen Pulverlösung. Dabei beträgt der Hämoglobingehalt etwa 20 %.

Wie ich oben mitgeteilt habe, gibt es keinen merklichen Unterschied in der adsorbierten Katalasemenge bei 10 Minuten und 24stündigem Kontakt von $(PO_4)_2Ca_3$ und Blutlösung. In dem nächsten Versuche habe ich untersucht, ob es irgendwelchen Unterschied in den Elutionen gibt, nach den beiden Kontaktzeiten.

Hier wurde in ganz gleicher Weise wie in dem oben stehenden Versuche, nur mit dem Unterschied der Kontaktdauer, verfahren. Die gleiche Menge von derselben Pulverlösung und $(PO_4)_2Ca_3$ wurden gemischt und 24 Stunden im Eisschrank aufbewahrt. Nach Ablauf dieser Zeit wurde das Gemisch zentrifugiert und filtriert. Der Niederschlag wurde dreimal mit 20 ccm destilliertem Wasser gewaschen. Danach wurde der Niederschlag zweimal mit 20 ccm m/150 Na_2HPO_4 behandelt.

Tabelle XXIV. $t = 20$ Minuten.

Verdünnte Lösung	+ $(PO_4)_2Ca_3$						
	Elution I		$\frac{K}{K'}$ [1]	Elution II		Niederschlag	
	$a - x$	K		$a - x$	K	$a - x$	K
ccm	ccm		%	ccm		ccm	
10	10,1	0,0148	46	17,8	0,0033	15,9	0,0050
5	14,5	0,0070	42	18,5	0,0017	17,8	0,0025
0	20,0	—	—	—	—	—	—
Hb.	etwa 17%			etwa 5%			

Der Hämoglobingehalt der Abgüsse war fast derselbe, wie bei den gleichartigen Abgüssen im vorigen Versuche.

Wie aus dieser Tabelle ersichtlich ist, enthält die Elution I im Vergleich zu derselben im vorigen Versuche etwas weniger Katalase und Hämoglobin. Daraus läßt sich entnehmen, daß die Elution mit der Verlängerung der Kontaktsdauer etwas erschwert wird.

Diese Tatsache ist auch aus dem nächsten Versuche zu ersehen.

7,5 ccm $(PO_4)_2Ca_3$-Suspension wurde zentrifugiert und das Wasser dekantiert. Der Niederschlag wurde mit je 15 ccm 1 proz. Pulverlösung [10 ccm Pulverlösung : 5 ccm $(PO_4)_2Ca_3$-Suspension] versetzt. Ein Gemisch wurde nach 10 Minuten und ein anderes nach 24stündigem Aufbewahren im Eisschrank zentrifugiert und filtriert. Der Niederschlag wurde zweimal mit 15 ccm destillierten Wassers gewaschen. Dann wurde der Niederschlag zweimal mit 15 ccm m/150 Na_2HPO_4 15 Minuten lang behandelt.

Elutionen: 10 ccm davon wurden mit m/15 KH_2PO_4 neutralisiert und mit destilliertem Waaser bis auf 20 ccm aufgefüllt; 2 ccm davon mit neutralem Phosphatgemisch bis auf 50 ccm.

[1] Hier ist K mit K′ in der vorigen Tabelle (d. h. im am vorigen Tage ausgeführten Versuche) verglichen.

Niederschläge: Der letzte Niederschlag mit destilliertem Wasser bis auf 15 ccm; 1 ccm davon mit neutralem Phosphatgemisch wiederum bis auf 50 ccm.

Kontrolle: Die gleichen Mengen von derselben Pulverlösung und $(PO_4)_2Ca_3$ wurden gemischt. Ein Gemisch wurde nach 10 Minuten und ein anderes nach 24stündigem Aufbewahren im Eisschrank zentrifugiert und abfiltriert. Der Niederschlag wurde mit destilliertem Wasser bis auf 15 ccm aufgefüllt, und 1 ccm davon wurde mit neutralem Phosphatgemisch wiederum bis auf 50 ccm aufgefüllt (Originaler Niederschlag).

Tabelle XXV.

$t = 20$ Minuten.

Verdünnte Lösung	Originaler Niederschlag		Mit Na_2HPO_4 eluiert						
			Elution I		$\frac{K}{K'}$	Elution II		Niederschlag	
ccm	$a-x$ ccm	K'	$a-x$ ccm	K	%	$a-x$ ccm	K	$a-x$ ccm	K
			1. Nach 10 Minuten.						
10	4,6	0,0314	11,5	0,0115	37	15,9	0,0044	12,1	0,0104
5	9,6	0,0154	15,0	0,0057	37	17,5	0,0024	15,4	0,0051
0	19,5	—	19,5	—	—	—	—	—	—
			2. Nach 24 Stunden.						
10	4,7	0,0308	13,6	0,0077	25	15,3	0,0052	11,2	0,0119
5	9,8	0,0148	16,3	0,0038	26	17,3	0,0025	14,9	0,0057
0	19,4	—	19,4	—	—	—	—	—	—

Wie ersichtlich ist, zeigt die Tabelle auch hier deutlich die im vorigen Versuch ermittelte Tatsache. Außerdem ist es hier bemerkenswert, daß die Elution I weniger Katalase enthält als diejenige bei dem Versuch, bei dem für 10 ccm Blutlösung 2,5 ccm $(PO_4)_2Ca_3$-Suspension verwendet war (s. Tabellen XXIII, XXIV), d. h. mit Vermehren der Menge des als Adsorbens angewandten $(PO_4)_2Ca_3$ wird die Elution etwas erschwert.

Die adsorbierte Katalase ist zum großen Teil durch Wiederholung der eluierenden Behandlungen freizulegen. Aber ein ganz kleiner Teil bleibt mit $(PO_4)_2Ca_3$ fest verbunden, wie aus dem folgenden Versuch hervorgeht.

50 ccm 10 proz. hämolytische Blutkörperchen aus Menschenblut wurden mit 40 ccm $(PO_4)_2Ca_3$-Suspension versetzt und eine Nacht im Eisschrank stehen gelassen, dann zentrifugiert und abfiltriert. Der Niederschlag wurde mit destilliertem Wasser so lange gewaschen, bis das Waschwasser keine Katalase und kein Hämoglobin mehr enthielt. Der gewaschene Niederschlag zeigte noch eine deutlich braune Farbe und wurde schließlich mit destilliertem Wasser bis auf 40 ccm aufgefüllt (Niederschlag I). 20 ccm davon wurden zentrifugiert und das Wasser dekantiert. Der erhaltene Niederschlag wurde neunmal nacheinander mit 20 ccm 0,5 proz. Na_2HPO_4 eluiert. Dann wurde der letzte Niederschlag mit destilliertem Wasser bis auf 20 ccm aufgefüllt (Niederschlag II).

Tabelle XXVI.

Etwa 0,3% H_2O_2-Lösung; im Brutofen von 37° C; t = 30 Minuten; titrieren mit n/10 Kaliumpermanganat.

Unverdünnte Lösung ccm	Niederschlag I $a - x$ ccm	Elution IX (mit KH_2PO_4 neutralisiert) $a - x$ ccm	Niederschlag II $a - x$ ccm
5,0	—	16,3	0,5
2,0	—	18,4	6,8
0,05	0,8	—	—
0,02	6,6	—	—
0	19,7	19,4	18,5

Wie ersichtlich ist, zeigt der letzte Niederschlag trotz neunmaliger Eluierung mit 0,5proz. Na_2HPO_4 noch eine geringe Katalasewirkung.

In bezug auf die Beständigkeit der adsorbierten Katalase habe ich folgende Versuche angestellt.

5 ccm $(PO_4)_2Ca_3$-Suspension wurde zentrifugiert und das Wasser dekantiert. Der Niederschlag wurde mit 20 ccm 0,5proz. Pulverlösung versetzt.

1. Ein solches Gemisch wurde nach 10 Minuten zentrifugiert und abfiltriert (Abguß). Der erhaltene Niederschlag wurde mit 20 ccm destillierten Wassers einmal gewaschen, dann von demselben entfernt und mit destilliertem Wasser bis auf 20 ccm aufgefüllt (Niederschlag) und sofort untersucht.

2. Ein solches Gemisch wurde nach 24stündigem Aufenthalt im Eisschrank in gleicher Weise wie bei 1. behandelt.

3. Ein solches Gemisch wurde in gleicher Weise wie bei 1. nach 10 Minuten zentrifugiert und abfiltriert. Der Niederschlag wurde mit 20 ccm destillierten Wassers einmal gewaschen, von demselben abgetrennt und mit destilliertem Wasser bis auf 20 ccm aufgefüllt. Die in solcher Weise erhaltene Suspension wurde etwa 24 Stunden im Eisschrank aufbewahrt und dann untersucht (Niederschlag).

Abgüsse: 2 ccm mit neutralem Phosphatgemisch bis auf 50 ccm; Niederschläge: mit destilliertem Wasser bis auf 20 ccm, 2 ccm davon mit neutralem Phosphatgemisch wiederum bis auf 50 ccm.

Tabelle XXVII.

Verdünnte Lösung	1. Nach 10 Minuten		2. Ohne Waschen 24 Stunden aufbewahrt		3. Nach Waschen 24 Std. aufbewahrt
	$a - x$ ccm (t = 20′)				
	Abguß	Niederschlag	Abguß	Niederschlag	Niederschlag
ccm	ccm	ccm	ccm	ccm	ccm
10	19,5	5,5	19,5	5,3	7,8
5	19,8	10,4	19,7	10,3	12,5
0	20,0	—	19,7	—	—

Wie aus der Tabelle ersichtlich ist, ist bei dem nach Waschen im Wasser suspendierten Niederschlag nach einem Tage schon eine gewisse Abschwächung eingetreten.

Es scheinen also in dem Niederschlag gewisse Begleitstoffe, welche Haltbarkeit des Enzyms schützen, nicht mit hineinzugehen.

Durch Trocknen verliert die adsorbierte Katalase erheblich ihre Wirksamkeit, wie aus dem nächsten Versuche hervorgeht.

5 ccm $(PO_4)_2Ca_3$-Suspension und 20 ccm 1 proz. Pulverlösung wurden nach 10 Minuten zentrifugiert und filtriert. Der Niederschlag wurde dreimal mit destilliertem Wasser gewaschen und zuerst im *Faust-Heim*schen Apparat, dann im Exsikkator getrocknet. Die ganze Menge des erhaltenen Pulvers wurde mit destilliertem Wasser bis auf 20 ccm aufgefüllt und 1 ccm davon wiederum mit neutralem Phosphatgemisch bis auf 50 ccm aufgefüllt. Als Kontrolle wurde der gleiche Niederschlag, ohne ihn zu trocknen, sofort untersucht, und dabei wurde der Niederschlag mit destilliertem Wasser bis auf 20 ccm und 1 ccm davon mit neutralem Phosphatgemisch wiederum bis auf 50 ccm aufgefüllt.

Tabelle XXVIII.

Verdünnte Lösung	Niederschlag (ohne Trocknen)	Getrockneter Niederschlag
	$a-x$ $(t=20')$	
ccm	ccm	ccm
10	5,1	18,2
5	10,2	18,9
0	19,9	19,7

Wie schon oben mitgeteilt wurde, kann die Katalase aus der Pulverlösung durch Adsorption mit $(PO_4)_2Ca_3$ und dann durch Eluieren mit Na_2HPO_4-Lösung vom Hämoglobin bis zu einem gewissen Grade gereinigt werden. Ich habe unten noch ein anderes Beispiel gebracht und dabei den Stickstoffgehalt der Elution mit derjenigen der Originalpulverlösung verglichen.

12,5 ccm $(PO_4)_2Ca_3$-Suspension wurde zentrifugiert und das Wasser dekantiert. Dem Niederschlag wurden 50 ccm 1 proz. Pulverlösung zugesetzt, nach 10 Minuten zentrifugiert und filtriert. Der Niederschlag wurde dreimal mit destilliertem Wasser gewaschen und dann mit 50 ccm m/150 Na_2HPO_4 15 Minuten lang behandelt.

Elution: 10 ccm davon wurden mit KH_2PO_4 neutralisiert und mit destilliertem Wasser bis auf 20 ccm aufgefüllt; 2 ccm davon wurden mit neutralem Phosphatgemisch wiederum bis auf 50 ccm aufgefüllt. Pulverlösung: 1 ccm davon mit neutralem Phosphatgemisch bis auf 50 ccm.

Tabelle XXIX.

Verdünnte Lösung	Pulverlösung					Elution					$\frac{K''}{K'}$
	$t=10'$		$t=20'$		Durchschnittl. K-Werte	$t=10'$		$t=20'$		Durchschnittl. K-Werte	
	$a-x$	K	$a-x$	K		$a-x$	K	$a-x$	K		
ccm	ccm		ccm		K'	ccm		ccm		K''	%
10	8,9	0,0345	4,3	0,0331	0,0338	12,6	0,0194	8,6	0,0180	0,0187	55
5	13,0	0,0181	9,4	0,0161	0,0171	15,8	0,0096	13,2	0,0087	0,0092	54
0	19,7	—	—	—	—	19,7	—	—	—	—	—

N-Gehalt. Pulverlösung: 131,6 mg (in 100 ccm); Elution: 23,8 mg (in 100 ccm unneutralisierter Lösung). (18 %.)

Bei Pulver 1, über welches Genaueres in Abschnitt I berichtet wurde, ist es ebenfalls gelungen, die Katalase von dem Hämoglobin bis zu einem gewissen Grade zu trennen, wie es aus den folgenden Versuchen hervorgeht.

20 ccm $(PO_4)_2Ca_3$-Suspension (die Suspension wurde durch mehrmaliges Zentrifugieren vom Kochsalz befreit) und 50 ccm 1 proz. Pulverlösung wurden gemischt und nach 10 Minuten zentrifugiert und filtriert. Der Niederschlag wurde viermal mit destilliertem Wasser gewaschen und mit 50 ccm m/150 Na_2HPO_4 15 Minuten lang behandelt. Zur Untersuchung der Wirksamkeit wurde die Verdünnung der Pulverlösung und der Elution in gleicher Weise wie beim vorigen Versuche vorgenommen.

Tabelle XXX. $t = 20$ Minuten.

Verdünnte Lösung ccm	Pulverlösung $a - x$ ccm	Pulverlösung K'	Elution $a - x$ ccm	Elution K''	$\frac{K''}{K'}$ %
10	4,9	0,0294	9,2	0,0158	54
5	10,0	0,0139	13,4	0,0076	55
2,5	13,9	0,0068	16,1	0,0036	53
0	19,0	—	19,0	—	—

N-Gehalt. Pulverlösung: 127,4 mg (in 100 ccm); Elution: 27,3 mg (in 100 ccm unneutralisierter Lösung). (21 %.)

Ich habe denselben Versuch auch bei einem anderen in gleicher Weise aus Pferdeblutkörperchen hergestellten Pulver angestellt und fast das gleiche Resultat erhalten.

Man kann also bei den aus Blutpulver hergestellten Lösungen die Ungleichheit der adsorbierten Mengen von der Katalase und dem Hämoglobin deutlich beobachten und durch Eluieren mit Na_2HPO_4 eine Katalaselösung, die wenig Hämoglobin enthält, bekommen.

In weiteren Versuchen habe ich geprüft, ob diese Erscheinung bei frischen Blutkörperchenlösungen beobachtet wird. Aber die Adsorptionsvorgänge spielen sich hier, wie man aus den folgenden Versuchen ersehen kann, etwas anderes als bei den Pulverlösungen ab.

Versuch 1.

Von 4,0 ccm frisch geschlagenem Kaninchenblut (Hämoglobingehalt = 63 % nach *Sahli*) wurden die Blutkörperchen abgetrennt, dreimal mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen, von derselben abgetrennt und mit destilliertem Wasser bis auf 40 ccm aufgefüllt. Die erhaltene Lösung wurde stark zentrifugiert und abfiltriert. Die gewonnene, ein wenig opake Lösung wurde zum Versuche benutzt. 10 ccm und 5 ccm $(PO_4)_2Ca_3$-Suspension wurden zentrifugiert und das Wasser dekantiert. Diese Niederschläge wurden mit je 10 ccm der Blutlösung versetzt und nach 10 Minuten zentrifugiert und abfiltriert.

Abgüsse: 0,5 ccm mit neutralem Phosphatgemisch bis auf 100 ccm. Niederschläge: mit destilliertem Wasser bis auf 10 ccm, 0,5 ccm davon mit neutralem Phosphatgemisch wiederum bis auf 100 ccm. Blutlösung: 0,5 ccm mit neutralem Phosphatgemisch bis auf 100 ccm.

Der Hämoglobingehalt wurde kolorimetrisch verglichen.

Tabelle XXXI.
$t = 20$ Minuten.

Verdünnte Lösung	Originale Blutlösung		10 ccm $(PO_4)_2Ca_3$				5 ccm $(PO_4)_2Ca_3$			
			Abguß		Niederschlag		Abguß		Niederschlag	
ccm	$a-x$ ccm	K	$a-x$ ccm	K	$a-x$ ccm	K	$a-x$ ccm	K	$a-x$ ccm	K
10	5,3	0,0277	17,4	0,0019	6,3	0,0240	8,8	0,0167	12,1	0,0098
5	10,2	0,0135	18,3	0,0008	10,9	0,0121	12,9	0,0084	15,1	0,0050
0	19,0	—	19,0	—	—	—	—	—	—	—
Hb.	100%		etwa 15%				etwa 45%			

Versuch 2.

5 ccm frisch geschlagenes Kaninchenblut (Hämoglobingehalt = 67 % nach *Sahli*) wurden in ganz gleicher Weise wie bei dem vorigen Versuch behandelt.

Tabelle XXXII.

Verdünnte Lösung	Originale Blutlösung		10 ccm $(PO_4)_2Ca_3$				5 ccm $(PO_4)_2Ca_3$			
			Abguß		Niederschlag		Abguß		Niederschlag	
ccm	$a-x$ ccm	K	$a-x$ ccm	K	$a-x$ ccm	K	$a-x$ ccm	K	$a-x$ ccm	K
10	4,5	0,0309	14,5	0,0055	6,4	0,0233	6,7	0,0223	13,0	0,0079
5	9,3	0,0152	16,4	0,0029	11,0	0,0115	11,5	0,0106	15,5	0,0041
0	18,7	—	18,7	—	—	—	—	—	—	—
Hb.	100%		etwa 20%				etwa 50%			

Versuch 3.

3 ccm frisch geschlagenes Kaninchenblut (Hämoglobingehalt = 69 % nach *Sahli*) wurden auch in gleicher Weise behandelt.

Tabelle XXXIII.
$t = 20$ Minuten.

Verdünnte Lösung	Originale Blutlösung		10 ccm $(PO_4)_2Ca_3$				5 ccm $(PO_4)_2Ca_3$			
			Abguß		Niederschlag		Abguß		Niederschlag	
ccm	$a-x$ ccm	K	$a-x$ ccm	K	$a-x$ ccm	K	$a-x$ ccm	K	$a-x$ ccm	K
10	4,1	0,0340	17,7	0,0022	5,0	0,0297	8,7	0,0176	10,2	0,0142
5	9,2	0,0164	18,7	0,0010	9,8	0,0151	13,1	0,0088	14,1	0,0072
0	19,6	—	19,6	—	—	—	—	—	—	—
Hb.	100%		etwa 20%				etwa 50%			

Wie aus den Tabellen ersichtlich ist, sind hier nicht so günstige Verhältnisse der adsorbierten Mengen der Katalase und des Hämoglobins, wie man es bei den Pulverlösungen beobachten konnte, zu erhalten. Im Gegenteil, bei Anwendung von 5 ccm $(PO_4)_2Ca_3$ scheint die Katalase im Vergleich zum Hämoglobin weniger adsorbiert zu werden und bei Anwendung von 10 ccm $(PO_4)_2Ca_3$ erst die günstigen Verhältnisse der adsorbierten Menge der beiden Substanzen einzutreten.

Noch einen Versuch habe ich angestellt mit einer Blutlösung, die 3 Tage im Eisschrank aufbewahrt war.

Von 3 ccm geschlagenem Kaninchenblut wurden die Blutkörperchen abgetrennt und in gleicher Weise mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen und mit destilliertem Wasser bis auf 30 ccm aufgefüllt. Diese hämolysierte Blutlösung wurde nach starkem Zentrifugieren und Filtrieren im Eisschrank 3 Tage stehengelassen. Nach Ablauf dieser Zeit zeigte die Lösung eine dunkelrote Farbe und eine merkbare Trübung. Mit dieser Lösung wurde der Versuch in gleicher Weise wie bei den vorigen Versuchen ausgeführt.

Tabelle XXXIV. $t = 20$ Minuten.

Verdünnte Lösung	Originale Blutlösung		10 ccm $(PO_4)_2Ca_3$				5 ccm $(PO_4)_2Ca_3$			
			Abguß		Niederschlag		Abguß		Niederschlag	
ccm	$a-x$ ccm	K	$a-x$ ccm	K	$a-x$ ccm	K	$a-x$ ccm	K	$a-x$ ccm	K
10	3,8	0,0352	18,5	0,0008	4,8	0,0301	10,9	0,0123	7,7	0,0198
5	8,6	0,0174	18,9	0,0003	9,5	0,0153	14,5	0,0061	12,2	0,0099
0	19,2	—	19,2	—	—	—	—	—	—	—

Die Abgüsse waren ganz klar, und ihr Hämoglobingehalt war wegen Trübung der Standardlösung schwer zu vergleichen, aber man konnte doch deutlich sehen, daß der Abguß bei 5 ccm $(PO_4)_2Ca_3$ stark dunkelrot gefärbt war und bei 10 ccm weniger, aber trotzdem noch deutlich gefärbt war. Hier ist die adsorbierte Menge der Katalase viel größer als bei den anderen drei Versuchen.

Die Ursache dieser Verschiedenheit der Adsorption in den einzelnen Versuchen, die aber nicht sehr groß war, ist mir nicht gelungen zu ermitteln. Ob die Verschiedenheit der Adsorption auf Unterschieden des kolloidalen Zustandes der Lösungen beruht oder durch Beeinflussung der Beimengungen verursacht ist, oder ob andere Momente hier eine Rolle spielen, ist schwer zu sagen.

8. Die Reinigung der Katalase durch kombinierte Anwendung von Chloroform und dreibasischem Calciumphosphat.

Im ersten Teil habe ich gezeigt, daß die in Blutlösungen enthaltene Katalase durch Chloroform gut gereinigt werden kann. Im zweiten Teil habe ich nachgewiesen, daß die Katalase durch dreibasisches Calciumphosphat adsorbiert und durch verdünnte Lösungen von

zweibasischem Natriumphosphat eluiert wird. Bei geeigneten Bedingungen erhält man so eine an Hämoglobin ärmere Fermentlösung.

Ich habe nun weiter geprüft, ob durch die kombinierte Anwendung der beiden Methoden die Katalase noch mehr gereinigt werden kann.

Die durch $(PO_4)_2Ca_3$ gereinigte Lösung verliert, wie schon mitgeteilt wurde, bei Versuchen mit Pulverlösung ungefähr 50% ihrer ursprünglichen Wirksamkeit, während der Hämoglobingehalt derselben bis auf etwa 20% vermindert wird. Wenn man diese Lösungen weiter mit Chloroform behandelt, so muß man auf noch weitere Verluste der Wirksamkeit rechnen. Schon aus diesem Grunde ist es klar, daß es vorteilhafter ist, die durch Chloroform gereinigte und hochwirksame eiweißarme Lösung weiter mit Calciumphosphat zu behandeln, als den umgekehrten Weg einzuschlagen.

Die Methode der Adsorption, bei der man das Adsorbat zunächst mit Wasser auswäscht, wobei Enzym nicht in Lösung geht und dann eluiert, so daß man nunmehr das Enzym in Lösung bringt, ist bekanntlich sehr geeignet, das Enzym von indifferenten, chemisch bekannten Stoffen zu trennen.

Experimentelles.

Die Wirksamkeit der Katalase wurde in gleicher Weise wie in den vorigen Versuchen geprüft.

Die $(PO_4)_2Ca_3$-Suspension wurde in gleicher Weise wie im Abschnitt 2 hergestellt.

Zuerst habe ich untersucht, ob die durch Chloroform gereinigte Katalase durch $(PO_4)_2Ca_3$ adsorbiert wird.

0,2 ccm und 0,1 ccm $(PO_4)_2Ca_3$-Suspension wurden zentrifugiert und das Wasser dekantiert. Zu diesen Niederschlägen wurde je 10 ccm einer aus Pulver durch Chloroform gereinigten Lösung (in diesen Versuchen wurden die Pulverlösungen benutzt, welche aus Pulver Nr. 2 hergestellt wurden) zugesetzt, gut gemischt und nach 10 Minuten zentrifugiert und abfiltriert.

Abgüsse: 1 ccm davon mit neutralem Phosphatgemisch bis auf 50 ccm.

Niederschläge: mit destilliertem Wasser bis auf 10 ccm; 1 ccm davon mit neutralem Phosphatgemisch wiederum bis auf 50 ccm.

Die ursprüngliche durch Chloroform gereinigte Fermentlösung: 1 ccm mit neutralem Phosphatgemisch bis auf 50 ccm.

Tabelle XXXV. $t = 20$ Minuten.

Verdünnte Lösung	Durch Chloroform gereinigte Fermentlösung		0,2 ccm $(PO_4)_2Ca_3$				0,1 ccm $(PO_4)_2Ca_3$			
			Abguß		Niederschlag		Abguß		Niederschlag	
	$a-x$	K	$a-x$	K	$a-x$	K	$a-x$	K	$a-x$	K
ccm	ccm		ccm		ccm		ccm		ccm	
10	6,4	0,0243	19,6	—	6,9	0,0227	18,2	0,0016	7,0	0,0212
5	11,2	0,0122	—	—	11,4	0,0118	19,0	0,0007	12,2	0,0103
0	19,6	—	19,6	—	—	—	—	—	—	—

Wie aus dieser Tabelle ersichtlich ist, wird die Katalase auch aus der durch Chloroform gereinigten Lösung durch passende Menge des $(PO_4)_2Ca_3$ quantitativ adsorbiert. Es ist hier auffallend, daß eine sehr kleine Menge von $(PO_4)_2Ca_3$ genügt, um das Ferment zu adsorbieren. Bei einer unreinen Pulverlösung kann die gleiche Menge des Calciumphosphats nur einen kleinen Teil von Katalase adsorbieren, wie man es aus dem nächsten Versuche sehen kann.

0,2 ccm $(PO_4)_2Ca_3$ wurde zentrifugiert und das Wasser dekantiert. Der Niederschlag wurde mit 10 ccm einer 1 proz. Pulverlösung versetzt und nach 10 Minuten zentrifugiert und abfiltriert.

Abguß: 1 ccm davon mit neutralem Phosphatgemisch bis auf 50 ccm.

Niederschlag: mit destilliertem Wasser bis auf 10 ccm; 1 ccm davon mit neutralem Phosphatgemisch wiederum bis auf 50 ccm.

Pulverlösung: 1 ccm davon mit neutralem Phosphatgemisch bis auf 50 ccm.

Tabelle XXXVI. $t = 20$ Minuten.

Verdünnte Lösung	Pulverlösung		0,2 ccm $(PO_4)_2Ca_3$			
			Abguß		Niederschlag	
	$a - x$	K	$a - x$	K	$x - a$	K
ccm	ccm		ccm		ccm	
10	4,0	0,0336	4,3	0,0320	18,0	0,0009
5	8,5	0,0172	9,2	0,0155	18,4	0,0005
0	18,8	—	18,8	—	—	—

Wie hier ersichtlich ist, wird die Katalase sehr wenig adsorbiert. Die Ursache muß höchstwahrscheinlich in dem Einfluß der Begleitstoffe gesucht werden.

Das Eluieren der adsorbierten Katalase ist auch hier durch eine verdünnte zweibasische Natriumphosphatlösung gelungen, wie es aus dem nächsten Versuch hervorgeht.

Je 0,2 ccm $(PO_4)_2Ca_3$-Suspension wurde mit je 10 ccm einer durch Chloroform gereinigten Lösung (aus dem Blutpulver) versetzt und nach 10 Minuten zentrifugiert und abfiltriert. Die Niederschläge wurden dreimal mit 20 ccm destilliertem Wasser gewaschen und vom Waschwasser abgetrennt. Dann wurde ein Niederschlag mit 10 ccm m/150 Na_2HPO_4 und ein anderer mit 10 ccm m/300 Na_2HPO_4 versetzt und unter öfterem Umrühren 15 Minuten bei Zimmertemperatur stehen gelassen, dann zentrifugiert und filtriert.

5 ccm der erhaltenen Filtrate wurden mit m/15 KH_2PO_4 neutralisiert und mit destilliertem Wasser bis auf 10 ccm, 2 ccm davon mit neutralem Phosphatgemisch bis auf 50 ccm wiederum aufgefüllt (Elution).

Die gewaschenen Niederschläge wurden mit destilliertem Wasser bis auf 10 ccm, 1 ccm davon mit neutralem Phosphatgemisch wiederum bis auf 50 ccm aufgefüllt (Niederschlag).

1 ccm der durch Chloroform gereinigten Fermentlösung wurde mit neutralem Phosphatgemisch bis auf 50 ccm aufgefüllt. (Die durch Chloroform gereinigte Fermentlösung.)

Tabelle XXXVII. $t = 30$ Minuten.

Verdünnte Lösung	Durch Chloroform gereinigte Fermentlösung		m/150 NaH_2PO_4				m/300 NaH_2PO_4			
			Elution		Niederschlag		Elution		Niederschlag	
ccm	$a-x$ ccm	K	$a-x$ ccm	K	$a-x$ ccm	K	$a-x$ ccm	K	$a-x$ ccm	K
10,0	3,3	0,0254	5,0	0,0194	16,9	0,0018	6,1	0,0165	14,3	0,0042
5,0	8,1	0,0124	10,0	0,0094	18,0	0,0009	11,3	0,0076	16,7	0,0019
2,5	12,3	0,0064	13,9	0,0046	18,6	0,0004	14,8	0,0037	17,8	0,0010
0	19,1	—	19,1	—	—	—	—	—	—	—

Wie ersichtlich ist, wird die adsorbierte Katalase zum größten Teil schon durch m/300 NaH_2PO_4 freigelegt.

In diesem Versuche enthielten die Abgüsse fast keine Katalasewirksamkeit und ebenfalls fast keine Trübung mehr bei Zusatz von Sulfosalicylsäure, während die durch Chloroform gereinigte Fermentlösung dabei noch eine schwache und die Elution eine zwar außerordentlich schwache, aber doch merkbare Trübung aufwies.

Im nächsten Versuche habe ich die Verteilung des Stickstoffs zwischen Abguß, Elution und Niederschlag untersucht.

0,4 ccm $(PO_4)_2Ca_3$ wurde zentrifugiert und das Wasser dekantiert. Der Niederschlag wurde mit 20 ccm einer durch Chloroform gereinigten Lösung (aus der Pulverlösung) versetzt, und nach 10 Minuten zentrifugiert und abfiltriert (Abguß). Der Niederschlag wurde viermal mit 20 ccm destilliertem Wasser gewaschen und von demselben abgetrennt. Dann wurde der Niederschlag mit 20 ccm m/150 Na_2HPO_4 versetzt und nach 15 Minuten zentrifugiert und abfiltriert.

Abguß: 1 ccm davon mit neutralem Phosphatgemisch bis auf 50 ccm.

Elution: 5 ccm davon wurde mit KH_2PO_4 neutralisiert und mit destilliertem Wasser bis auf 10 ccm aufgefüllt; 2 ccm davon mit neutralem Phosphatgemisch bis auf 50 ccm

Niederschlag: Der letzte Niederschlag wurde mit destilliertem Wasser bis auf 20 ccm; 1 ccm davon mit neutralem Phosphatgemisch wiederum bis auf 50 ccm.

Ursprüngliche durch Chloroform gereinigte Fermentlösung: 1 ccm davon mit neutralem Phosphatgemisch bis auf 50 ccm.

Tabelle XXXVIII. $t = 20$ Minuten.

Verdünnte Lösung	Durch Chloroform gereinigte Fermentlösung		Mit Na_2HPO_4 behandelt						
			Abguß		Elution			Niederschlag	
ccm	$a-x$ ccm	K'	$a-x$ ccm	K	$a-x$ ccm	K	$\frac{K}{K'}$	$a-x$ ccm	K
10	6,0	0,0250	18,9	—	7,8	0,0193	77%	18,3	0,0008
5	10,8	0,0123	—	—	12,2	0,0096	78%	18,6	0,0005
0	19,0	—	19,0	—	—	—	—	—	—
N-Gehalt	2,10 mg (in 100 ccm unverdünnter Lösung)		1,16 mg (in 100 ccm unverdünter Lösung)		0,36 mg (in 100 ccm unverdünnter unneutralisierter Lösung)			0,14 mg (in 100 ccm der Suspension, bei der der letzte Niederschlag mit dest. Wasser bis auf 20 ccm aufgefüllt wurde)	

Wie ersichtlich ist, behält hier die Elution durchschnittlich eine 77,5proz. Wirksamkeit der ursprünglichen Fermentlösung und der Abguß fast gar keine, während die Elution nur etwa $^1/_4$ der Menge des Stickstoffs der ursprünglichen Lösung und der Abguß etwa $1/2$ der Menge enthält. Mit Sulfosalicylsäure reagierte der Abguß fast gar nicht, dagegen zeigte die Elution eine sehr schwache, aber noch bemerkbare Reaktion. Daraus könnte man entnehmen, daß der Stickstoff, welcher aus dem genuinen Eiweiß herrührt, unadsorbiert im Abguß zurückbleibt. Außerdem ist es hier merkwürdig, daß die Elution durch Zusatz von Salpetersäure und Silbernitrat fast gar keine Trübung zeigte, während der Abguß damit eine deutliche Trübung aufwies. Folglich kann das in der ursprünglichen Lösung befindliche Kochsalz durch mehrmaliges Waschen dieses $(PO_4)_2Ca_3$-Niederschlages mit Wasser entfernt werden.

Ich habe weiter in den folgenden Versuchen die Wirksamkeit, den Trockenrückstand (80 bis 100° C) und Stickstoffgehalt der durch $(PO_4)_2Ca_3$ behandelten Lösung mit denselben der ursprünglichen Pulverlösung und der durch Chloroform gereinigten Lösung verglichen.

1,0 ccm $(PO_4)_2Ca_3$-Suspension wurde zentrifugiert und das Wasser dekantiert. Der Niederschlag wurde mit 50 ccm einer durch Choloroform gereinigten Fermentlösung (aus der Pulverlösung) versetzt und nach 10 Minuten zentrifugiert und abfiltriert (Abguß). Dann wurde der Niederschlag viermal mit 50 ccm destilliertem Wasser gewaschen und mit 50 ccm m/150 Na_2HPO_4 15 Minuten lang behandelt. Die erhaltene Elution war wasserklar und zeigte keinen Farbenton mehr, während die ursprüngliche durch Chloroform gereinigte Lösung einen schwachen gelben Ton und der Abguß einen viel schwächeren, aber doch merkbaren gelben Ton zeigte.

Abguß: 1 ccm davon mit neutralem Phosphatgemisch bis auf 50 ccm.

Elution: 5 ccm davon mit KH_2PO_4 neutralisiert und mit destilliertem Wasser bis auf 10 ccm; 2 ccm davon mit neutralem Phosphatgemisch bis auf 50 ccm. Ursprüngliche Pulver- und durch Chloroform gereinigte Lösung: 1 ccm davon mit neutralem Phosphatgemisch bis auf 50 ccm.

Tabelle XXXIX. $t = 20$ Minuten.

Verdünnte Lösung	Pulverlösung		Durch Chloroform gereinigte Lösung			Mit $(PO_4)_2Ca_3$ behandelt				
						Abguß	Elution			
ccm	$a-x$ ccm	K'	$a-x$ ccm	K''	$\frac{K''}{K'}$	$a-x$ ccm	$a-x$ ccm	K'''	$\frac{K'''}{K''}$	$\frac{K'''}{K'}$
10	4,1	0,0338	5,7	0,0265	78%	19,3	7,6	0,0202	76%	60%
5	9,3	0,0160	10,7	0,0128	80%	—	12,1	0,0101	79%	63%
0	19,4	—	19,3	—	—	19,3	—	—	—	—

	Trockenrückstand g	N-Gehalt mg	Wirksamkeit %
Pulverlösung, unverdünnt (in 100 ccm) . .	0,824	126,0	100
Die durch Chloroform gereinigte Lösung, unverdünnt (in 100 ccm)	0,029	2,05	79
Elution, unverdünnt und nicht neutralisiert (in 100 ccm)	0,100	0,40	61,5
Abguß, unverdünnt (in 100 ccm)	0,026	1,02	fast nichts

Wie ersichtlich ist, wird die Katalase durch eine kombinierte Anwendung der beiden Reinigungsmethoden in hohem Grade vom Stickstoff befreit, bei gleichzeitiger Beibehaltung ihrer ziemlich starken Wirksamkeit. Die durch $(PO_4)_2Ca_3$ gereinigte Lösung enthält etwas mehr Trockenrückstand als die ursprüngliche nur durch Chloroform gereinigte. Aber das ist wahrscheinlich zum größten Teil durch die absichtliche Zusetzung des zweibasischen Natriumphosphats zu erklären. Der Abguß enthält hier, trotz fast keiner Katalasewirkung, ungefähr eine gleiche Menge von Trockenrückstand wie die ursprünglich durch Chloroform gereinigte. Natürlich muß man hier nicht übersehen, daß der Abguß eine kleine Menge von dem gelösten als Adsorbens angewandten dreibasischen Calciumphosphat enthalten kann. Aber ich konnte schon feststellen, daß in diesen ersten und auch in einigen nachfolgenden Abgüssen Stickstoff und Kochsalz nachgewiesen werden können, ohne dabei eine Katalasewirkung zu beobachten. Folglich kann man daraus wenigstens annehmen, daß die Katalase durch diese Behandlung von einem gewissen Teil des Stickstoffs und von der fast ganzen Menge des Kochsalzes befreit werden kann.

In weiteren Versuchen habe ich geprüft, ob diese günstigen Resultate ebenfalls bei der aus frischem Blut durch Chloroform gereinigten Lösung erhalten werden können.

Wie schon im Abschnitt II berichtet wurde, scheint die frische Blutkörperchenlösung gegen $(PO_4)_2Ca_3$ sich etwas anders als die Pulverlösung zu verhalten. Die Mengen, welche zur quantitativen Adsorption dienen, sind nicht für alle Lösungen immer gleich. Es ist hier merkwürdig, daß die aus frischem Blut durch Chloroform gereinigten Lösungen im Vergleich zu der aus Pulver gereinigten erheblich mehr $(PO_4)_2Ca_3$ brauchen. Worauf diese Verschiedenheiten beruhen, ist schwer zu erklären. Aber es scheint mir, daß diese Verschiedenheiten nicht nur durch die Unterschiede des Eiweiß- oder Fermentgehalts der ursprünglichen Lösungen allein zu erklären sind.

Der Adsorptionsvorgang ist bei der aus frischem Blut gereinigten Lösung beispielsweise folgender: Die angewandten gereinigten Lösungen wurden aus 10% frischen Kaninchenblutkörperchenlösungen mit Chloroform wie immer hergestellt.

3,0 ccm und 2,0 ccm $(PO_4)_2Ca_3$-Suspension wurden zentrifugiert und das Wasser dekantiert. Die erhaltenen Niederschläge wurden mit je 10 ccm einer aus frischem Kaninchenblut gereinigten Lösung versetzt und nach 10 Minuten zentrifugiert und abfiltriert.

Abgüsse: 0,5 ccm davon mit neutralem Phosphatgemisch bis auf 100 ccm.

Niederschläge: mit destilliertem Wasser bis auf 10 ccm; 0,5 ccm davon mit neutralem Phosphatgemisch wiederum bis auf 100 ccm.

Die durch Chloroform gereinigte Fermentlösung: 0,5 ccm davon mit neutralem Phosphatgemisch bis auf 100 ccm.

Tabelle XL.
$t = 20$ Minuten.

Verdünnte Lösung	Durch Chloroform gereinigte Fermentlösung		3 ccm $(PO_4)_2Ca_3$				2 ccm $(PO_4)_2Ca_3$			
			Abguß		Niederschlag		Abguß		Niederschlag	
ccm	$a-x$ ccm	K	$a-x$ ccm	K	$a-x$ ccm	K	$a-x$ ccm	K	$a-x$ ccm	K
10	4,7	0,0315	19,8	—	5,1	0,0297	17,7	0,0027	6,2	0,0254
5	10,0	0,0151	19,9	—	10,2	0,0146	18,8	0,0013	11,3	0,0124
0	20,0	—	20,0	—	—	—	—	—	—	—

Wie ersichtlich ist, wird die Katalase hier erst durch 3 ccm $(PO_4)_2Ca_3$-Suspension fast quantitativ adsorbiert. Dagegen adsorbiert bei einer anderen gleichartigen Lösung dieselbe Menge dieser Suspension nicht die ganze Katalase, wie aus dem nächsten Versuche hervorgeht.

3 ccm $(PO_4)_2Ca_3$-Suspension wurden zentrifugiert und das Wasser dekantiert. Dieser Niederschlag wurde mit 10 ccm einer aus frischem Kaninchenblut gereinigten Lösung versetzt und in gleicher Weise, wie im vorigen Versuche weiter behandelt.

Tabelle XLI.
$t = 20$ Minuten.

Verdünnte Lösung	Durch Chloroform gereinigte Fermentlösung		3 ccm $(PO_4)_2Ca_3$			
			Abguß		Niederschlag	
ccm	$a-x$ ccm	K	$a-x$ ccm	K	$a-x$ ccm	K
10	2,9	0,0419	9,5	0,0162	6,1	0,0258
5	7,5	0,0213	13,6	0,0084	11,1	0,0128
0	20,0	—	20,0	—	—	—

Wie ersichtlich ist, sind die Mengen des $(PO_4)_2Ca_3$, welche zur quantitativen Adsorption dienen, nicht immer gleich, aber dieselben sind im Vergleich zur ursprünglichen nicht vorgereinigten Blutlösung im allgemeinen geringer.

In bezug auf das Eluieren ist es auch hier gelungen, aus den Adsorbaten mit verdünnter zweibasischer Natriumphosphatlösung eine anscheinend wasserklare Lösung zu erhalten, welche ärmer an Stickstoff ist und fast gar kein Kochsalz enthält, bei gleichzeitiger Beibehaltung der verhältnismäßig starken Wirksamkeit.

So wurden 25 ccm $(PO_4)_2Ca_3$-Suspension zentrifugiert und das Wasser dekantiert. Dieser Niederschlag wurde mit 50 ccm einer durch Chloroform gereinigten Lösung, welche aus 10 proz. frischer Kaninchenblutkörperchenlösung wie immer hergestellt wurde, versetzt (5 ccm Suspension: 10 ccm der durch Chloroform gereinigten Lösung) und nach 10 Minuten zentrifugiert und filtriert (Abguß). Der Niederschlag wird sechsmal mit 50 ccm destilliertem Wasser gewaschen und von demselben abgetrennt. Dann

wurde der Niederschlag mit 50 ccm m/150 Na_2HPO_4 versetzt, 15 Minuten lang unter öfterem Umrühren stehengelassen und abfiltriert. Die Elution war anscheinend wasserklar und zeigte durch Sulfosalicylsäure eine sehr schwache und durch Salpetersäure und Silbernitrat fast keine Trübung, während der Abguß durch Sulfosalicylsäure fast keine und durch Salpetersäure und Silbernitrat eine deutliche Trübung aufwies.

Abguß: 0,5 ccm davon mit neutralem Phosphatgemisch bis auf 100 ccm.

Elution: 5 ccm davon mit KH_2PO_4 neutralisiert und mit destilliertem Wasser bis auf 10 ccm; 1 ccm davon mit neutralem Phosphatgemisch bis auf 100 ccm. Die durch Chloroform gereinigte Fermentlösung: 0,5 ccm davon mit neutralem Phosphatgemisch bis auf 100 ccm.

Tabelle XLII. Abguß.

Verdünnte Lösung	Durch Chloroform gereinigte Lösung							Elution					
	$t = 20'$		$t = 10'$		$t = 20'$		Durchschnittl. K-Werte	$t = 10'$		$t = 20'$		Durchschnittl. K-Werte	$\frac{K''}{K'}$
ccm	$a - x$ ccm	K	$a - x$ ccm	K	$a - x$ ccm	K	K'	$a - x$ ccm	K	$a - x$ ccm	K	K''	%
10	18,5	0,0014	9,0	0,0340	4,4	0,0326	0,0333	11,3	0,0241	7,0	0,0225	0,0233	70
5	19,0	0,0008	13,4	0,0167	9,5	0,0158	0,0163	15,0	0,0118	12,0	0,0108	0,0113	69
0	19,7	—	19,7	—	—	—	—	19,7	—	—	—	—	—

	Trockenrückstand g	N-Gehalt mg
Ursprüngliche durch Chloroform gereinigte, unverdünnte Fermentlösung (in 100 ccm)	0,067	2,8
Elution, unverdünnt und nicht neutralisiert (in 100 ccm)	0,085	0,72
Abguß, unverdünnt (in 100 ccm)	0,043	1,14

Wie ersichtlich ist, beträgt die Wirksamkeit der Elution etwa 70% von der ursprünglichen Lösung, während der Stickstoffgehalt bis auf etwa $1/4$ der Menge sich verminderte. Dabei bleibt verhältnismäßig eine große Menge von Stickstoff im Abguß zurück, während hier nur eine ganz unbedeutende Wirksamkeit zu beobachten ist.

Noch ein gleicher Versuch ist angestellt worden mit einer durch Chloroform gereinigten Lösung, welche ebenfalls aus 10% frischer Kaninchenblutkörperchenlösung hergestellt wurde und 82% Wirksamkeit der ursprünglichen Blutlösung behielt[1]). 15 ccm $(PO_4)_2Ca_3$-Sus-

[1]) 0,5 ccm dieser Blutlösung wurden mit neutralem Phosphatgemisch bis auf 100 ccm aufgefüllt.

Verdünnte Lösung ccm	$a - x$ $(t = 20')$ ccm	K
10	3,6	0,0369
5	8,7	0,0178
0	19,7	—

Diese K-Werte werden mit den in der Reaktionszeit von 20 Minuten erhaltenen K-Werten der durch Chloroform gereinigten Lösung (siehe Tabelle XLIII) verglichen und als prozentuale Ausbeute berechnet.

pension wurden zentrifugiert und das Wasser dekantiert. Der Niederschlag wurde mit 50 ccm dieser durch Chloroform gereinigten Lösung versetzt (3 ccm Suspension: 10 ccm der durch Chloroform gereinigten Lösung) und in gleicher Weise wie im vorigen Versuch weiter gearbeitet. Die erhaltene Elution war ebenfalls anscheinend wasserklar und zeigte durch Sulfosalicylsäure eine sehr schwache und durch Salpetersäure und Silbernitrat fast keine Trübung. Der Abguß reagierte, wie im vorigen Versuch, fast nicht durch Sulfosalicylsäure — und stark durch Salpetersäure — und Silbernitratzusatz.

Tabelle XLIII.

Abguß.

Verdünnte Lösung	Durch Chloroform gereinigte Fermentlösung							Elution					$\frac{K''}{K'}$
	$t = 20'$		$t = 10'$		$t = 20'$		Durchschnittl. K-Werte	$t = 10'$		$t = 20'$		Durchschnittl. K-Werte	
ccm	$a - x$ ccm	K	$a - x$ ccm	K	$a - x$ ccm	K	K'	$a - x$ ccm	K	$a - x$ ccm	K	K''	%
10	19,4	0,0008	9,6	0,0321	5,0	0,0302	0,0312	11,6	0,0239	7,3	0.0220	0,0230	74
5	19,7	0,0004	13,7	0,0167	10,3	0,0145	0,0156	15,6	0,0110	12,2	0,0108	0,0109	70
0	20,1	—	20,1	—	—	—	—	20,1	—	—	—	—	—

	Trockenrückstand g	N-Gehalt mg
Ursprüngliche durch Chloroform gereinigte, unverdünnte Fermentlösung (in 100 ccm)	0,065	2,63
Elution, unverdünnt und nicht neutralisiert (in 100 ccm)	0,092	0,7
Abguß, unverdünnt (in 100 ccm)	0,044	1,03

Wie ersichtlich ist, besteht hier ebenfalls eine verhältnismäßig starke Wirksamkeit und geringer Stickstoff im Vergleich zu der ursprünglichen, durch Chloroform gereinigten Fermentlösung, und zwar behält die ursprüngliche durch Chloroform gereinigte Lösung etwa 82% Wirksamkeit der Blutlösung, also behält die endgültige Elution etwa 60% Wirksamkeit der ursprünglichen Blutlösung.

Der schließlich erhaltene Trockenrückstand gibt auch keinen Maßstab für die Menge der durch die Reinigung entfernten Begleitstoffe. Denn durch die Elution mit Natriumphosphat kommt viel fremde Substanz in die Lösung, wodurch das Ergebnis viel ungünstiger erscheint, als es wirklich ist.

Ebenso wie man im ersten Abschnitt sehen kann, enthält auch hier die durch Chloroform gereinigte Lösung unter bestimmten Bedingungen nur einen geringen Trockenrückstand und wenig Stickstoff, bei gleichzeitiger Beibehaltung der starken Wirksamkeit. Durch den

nachfolgenden Adsorptionsversuch mit $(PO_4)_2Ca_3$ wird die Katalase weiter vom beigemengten Stickstoff und von Kochsalz befreit, ohne an Wirksamkeit stark einzubüßen.

4. Anhang.

Beständigkeit der gereinigten Katalase.

Endlich habe ich noch einige Beobachtungen über die Beständigkeit der gereinigten Katalase gemacht.

Die benutzte Katalaselösung wurde aus frischen Kaninchenblutkörperchen hergestellt, weil die Lösungen derselben keine großen Unterschiede mit den aus Pulver hergestellten Lösungen an Stickstoffgehalt aufweisen, aber dafür bedeutend wirksamer im Vergleich zu den aus Pulver hergestellten Lösungen sind. Die Lösungen wurden in genau gleicher Weise wie in den vorigen Abschnitten mitgeteilt wurde, hergestellt, und zwar durch Anwendung von Chloroform und durch Adsorption mit $(PO_4)_2Ca_3$ und mit nachfolgender Eluierung mit m/150 Na_2HPO_4.

Die in solcher Weise erhaltenen Elutionen wurden gewöhnlich in folgender Weise weiter behandelt. 40 ccm Elution wurde mit m/15 KH_2PO_4 genau neutralisiert und mit destilliertem Wasser bis auf 50 ccm aufgefüllt. Die erhaltenen anscheinend wasserklaren Fermentlösungen wurden mit einigen Tropfen Chloroform versetzt und fest verschlossen im Eisschrank aufbewahrt. Die Lösungen blieben über 3 Wochen klar, ohne daß eine merkbare Abschwächung der Wirksamkeit dabei zu beobachten ist.

Die Bestimmung der Katalase wurde hier ebenfalls bei einer Temperatur von 2° C ausgeführt. Eine bestimmte Menge H_2O_2-Lösung, die $^1/_{150}$ molare Konzentration des neutralen Phosphatgemisches enthält, wurde in *Erlenmeyer*schen Kolben verteilt und im Eiswasser abgekühlt. Die zu prüfende Fermentlösung wurde mit m/150 abgekühltem Phosphatgemisch in passender Weise verdünnt und immer 10 ccm davon in H_2O_2-Lösung sofort pipettiert. Nach 10, 20, 30 und 40 Minuten Aufenthalt im Eiswasser wurde die Mischung mit 15 ccm 20proz. H_2SO_4 versetzt und dann mit n/50 $KMnO_4$ titriert.

Die K-Werte wurden aus der Formel der monomolekularen Reaktion berechnet.

1. Der Einfluß der als Puffer zugefügten Phosphatlösung auf die Katalasewirkung.

Es ist eine schon bekannte Tatsache, daß das Optimum für die Katalasewirkung sich in der Nähe vom neutralen Punkt bei Erhaltung der Reaktion durch Pufferzusatz befindet. Bei meiner gereinigten Katalaselösung ist es sichtbar, daß die Wirkung bei Zusatz von neutralem Phosphatgemisch etwas stärker ausfällt als ohne Pufferzusatz und die molare Konzentration des Phosphatgemisches mit m/150 mol. genügend scheint.

Tabelle XLIV. 50 ccm etwa n/100 H_2O_2-Lösung + 10 ccm verdünnte Fermentlösung (0,4 ccm Ferment + 100 ccm destilliertes Wasser). Die molare Konzentration des Phosphatgemisches in H_2O_2-Lösung betrug 1. 0, 2. $^1/_{150}$ mol. und 3. $^1/_{30}$ mol.

Zeit in Minuten	1. Ohne Pufferzusatz ($p_H = 6,2$)		2. etwa m/150 Phosphatgemisch ($p_H = 7,0$)		3. etwa m/30 Phosphatgemisch ($p_H = 7,0$)	
	$a - x$ ccm	K	$a - x$ ccm	K	$a - x$ ccm	K
0	24,7	—	24,7	—	24,7	—
10	12,9	0,0282	12,2	0,0306	12,3	0,0303
20	7,4	0,0262	6,9	0,0277	7,0	0,0274
30	4,5	0,0247	4,0	0,0264	4,2	0,0257
40	2,8	0,0236	2,6	0,0244	2,7	0,0240

2. Der Einfluß der Temperatur.

Über den Einfluß der Temperatur auf die Katalase sind schon viele Berichte veröffentlicht worden[1]). Nach *Italie*[2]) verliert Menschenblut durch 30 Minuten langes Erhitzen auf 63°C den größten Teil und Pferdeblut unter diesen Umständen vollständig die Katalasewirkung. *Euler* und *Borgenstaim*[3]) geben in einer Mitteilung an, daß in Erythrocyten aus Pferdeblut durch Erwärmen auf etwa 57°C eine Aktivierung der Katalase von rund 170% erreicht wird.

Die Versuche werden in folgender Weise ausgeführt: etwa 2 ccm unverdünnte Fermentlösung wurde in einem kleinen Reagenzglas im Wasserbad von einer bestimmten Temperatur eine bestimmte Zeit stehen gelassen. Unmittelbar nach der Erwärmung wurde das Reagenzglas in Eiswasser abgekühlt und eine bestimmte Menge dieser Fermentlösung wurde mit einem m/150 abgekühlten neutralen Phosphatgemisch verdünnt.

Tabelle XLV.

50 ccm etwa n/100 H_2O_2-Lösung + 10 ccm einer verdünnten Fermentlösung (0,4 ccm Ferment + 200 ccm m/150 neutrales Phosphatgemisch).

Zeit in Minuten	Nicht erwärmte Fermentlösung (Kontrolle)		Temperatur und Dauer: 45°C (± 0,5°C) 10'		45°C (± 0,5°C) 30'		$\frac{K''}{K}$
	$a - x$ ccm	K	$a - x$ ccm	K'	$a - x$ ccm	K''	%
0	4,7	—	24,7	—	24,7	—	—
10	17,7	0,0145	18,3	0,0130	18,9	0,0116	80
20	13,3	0,0134	14,4	0,0117	14,9	0,0110	82
30	10,7	0,0121	11,4	0,0112	12,4	0,0100	83
40	8,5	0,0116	9,1	0,0108	10,3	0,0095	82
							82

[1]) *C. Oppenheimer*, Die Fermente u. ihre Wirkungen. 2. Bd. Leipzig 1913.
[2]) *Van Italie*, C. r. Soc. Biol. **60**, 148, 1906, zitiert nach [3]).
[3]) *H. v. Euler* und *E. Borgenstaim*, diese Zeitschr. **102**, 1920.

50 ccm etwa n/100 H_2O_2-Lösung + 10 ccm einer verdünnten Fermentlösung (0,4 ccm Ferment + 200 ccm m/150 neutrales Phosphatgemisch).

Zeit in Minuten	Nicht erwärmte Fermentlösung (Kontrolle)		Temperatur und Dauer			
			55°C (± 0,5°C) 30′		65°C (± 0,5°C) 30′	
	a — x ccm	K	a — x ccm	K	a — x ccm	K
0	24,8	—	24,8	—	24,8	—
10	17,8	0,0144	24,0	0,0014	24,8	—
20	13,0	0,0140	23,6	0,0011	24,7	—
30	10,4	0,0126	23,3	0,0009	24,7	—
40	8,4	0·0118	23,0	0,0008	24,8	—

Wie ersichtlich ist, verliert die aus frischenKaninchenblutkörperchen gereinigte Lösung ungefähr 20% ihrer Wirksamkeit beim Erhitzen während 30 Minuten auf etwa 45°C, den größten Teil davon bei 55°C, und fast vollständig bei etwa 65°C.

Auch bei der aus Pulver gereinigten Lösung (aus Pferdeblutkörperchen) wurden die gleichen Resultate erhalten, wie aus folgender Tabelle ersichtlich ist.

Tabelle XLVI.

50 ccm etwa m/100 H_2O_2-Lösung + 10 ccm einer verdünnten Fermentlösung (1,6 ccm Ferment + 200 ccm m/150 neutrales Phosphatgemisch).

Zeit in Minuten	Nicht erwärmte Fermentlösung (Kontrolle)		Temperatur und Dauer				
			45°C (± 0,5°C) 30′			55°C (± 0,5°C) 30′	
	a — x ccm	K	a — x ccm	K′	K′/K %	a — x ccm	K″
0	25,0	—	25,0	—	—	25,0	—
10	18,2	0,0138	19,2	0,0115	83	24,4	0,0011
20	14,0	0,0126	15,2	0,0108	86	24,0	0,0009
30	11,6	0,0111	13,3	0,0091	82	—	—
40	10,2	0,0097	12,1	0,0079	81	23,7	0,0006
					83		

8. Die Beständigkeit der verdünnten Katalaselösung.

Die nicht verdünnte gereinigte Katalaselösung zeigt gewöhnlich wochenlang keine merkbare Abschwächung der Wirksamkeit. Aber in verdünntem Zustande ist die Katalase wenig beständig, wie aus den folgenden Versuchen hervorgeht.

0,8 ccm Ferment wurde mit 200 ccm abgekühltem destillierten Wasser (p_H = 6,2) versetzt und 10 ccm dieser verdünnten Lösung wurden sofort, nach 30 und 60 Minuten Aufenthalt im Eiswasser in H_2O_2-Lösung pipettiert.

Tabelle XLVII.
50 ccm etwa n/100 H_2O_2-Lösung + 10 ccm einer verdünnten Fermentlösung (0,8 ccm Ferment + 200 ccm destilliertes Wasser).

Zeit in Minuten	Sofort untersucht (Kontrolle)		Nach 30 Minuten			Nach 60 Minuten		$\frac{K''}{K}$
	$a-x$ ccm	K	$a-x$ ccm	K'	$\frac{K'}{K}$ %	$a-x$ ccm	K''	%
0	24,7	—	24,7	—	—	24,6	—	—
10	11,6	0,0328	13,2	0,0272	83	13,3	0,0267	81
20	6,5	0,0290	7,6	0,0256	88	7,9	0,0247	85
30	3,9	0,0267	4,8	0,0237	89	5,1	0,0228	85
40	2,3	0,0258	3,1	0,0225	87	3,2	0,0221	87
					87			85

Die geringe Beständigkeit der verdünnten Lösung wird nicht nur bei der Verdünnung mit destilliertem Wasser, sondern auch bei der Verdünnung des Ferments mit neutralem Phosphatgemisch beobachtet.

Je 0,4 ccm Ferment wurden mit 100 ccm eines m/150, m/30, m/15 neutralen Phosphatgemisches versetzt, und diese verdünnten Lösungen wurden sofort und nach 30 Minuten Aufenthalt im Eiswasser untersucht. Die molare Konzentration des Phosphatgemisches in H_2O_2-Lösung betrug immer $^1/_{150}$ mol.

Tabelle XLVIII.
50 ccm etwa n/100 H_2O_2-Lösung + 10 ccm verdünnter Katalaselösung.

Zeit in Minuten	Sofort untersucht		Nach 30 Minuten		$\frac{K'}{K}$
	$a-x$ ccm	K	$a-x$ ccm	K'	%
	Mit m/150 neutralem Phosphatgemisch verdünnt.				
0	24,3	—	24,3	—	—
10	11,9	0,0310	13,3	0,0262	85
20	6,7	0,0280	7,9	0,0244	87
30	4,2	0,0254	4,9	0,0232	91
40	2,6	0,0243	3,3	0,0217	89
					88
	Mit m/30 neutralem Phosphatgemisch verdünnt.				
0	24,4	—	24,4	—	—
10	12,7	0,0284	13,6	0,0254	89
20	7,5	0,0256	8,8	0,0222	87
30	4,9	0,0232	5,9	0,0206	89
40	3,0	0,0228	3,6	0,0208	91
					89
	Mit m/15 neutralem Phosphatgemisch verdünnt.				
0	24,4	—	24,4	—	—
10	12,8	0,0280	14,4	0,0229	82
20	7,7	0,0251	8,9	0,0219	87
30	4,8	0,0235	5,9	0,0206	88
40	3,1	0,0224	4,2	0,0191	85
					86

4. Der Einfluß der Aminosäuren und des Harnstoffs auf die verdünnten Katalaselösungen.

Wie aus dem vorigen Abschnitt ersichtlich ist, ist die verdünnte Katalaselösung wenig beständig, obwohl durch Pufferzusatz die neutrale Reaktion sichergestellt wurde. Ich habe nunmehr untersucht, ob Aminosäuren und Harnstoff irgend einen Einfluß auf die Labilität der verdünnten Katalaselösungen ausüben. Die benutzte Katalaselösung enthielt sehr wenig Stickstoff, und zwar 100 ccm dieser Lösung enthielten weniger als 1,0 mg N. Also sind diese Katalaselösungen geeignet, um den Einfluß der N-haltigen Substanzen zu prüfen. Als Aminosäuren wurden hier Glykokoll (Glykokoll „*Kahlbaum*") und α-Alanin (α-Alanin „*Kahlbaum*) angewandt. Als Harnstoff wurde Harnstoff „*Kahlbaum*" benutzt.

Versuch 1.

2,0 g Glykokoll wurde in 400 ccm m/150 Phosphatgemisch gelöst (Glykokollösung). 0,8 ccm Ferment wurde mit 200 ccm Glykokolllösung versetzt (Katalase-Glykokollösung). Als Kontrolle wurden 0,8 ccm Ferment mit m/150 Phosphatgemisch versetzt (Katalase-Phosphatlösung). Die beiden verdünnten Katalaselösungen wurden sofort und nach etwa 24 stündigem Aufbewahren im Eisschrank untersucht. Die Wasserstoffionenkonzentration war bei beiden fast gleich, und zwar betrug p_H = etwa 7,0.

Tabelle XLIX.

Zeit in Minuten	Sofort untersucht		Nach 24 Stunden		$\frac{K'}{K}$
	a — x ccm	K	a — x ccm	K'	%
In Glykokoll aufbewahrt. 25 ccm etwa n/50 H_2O_2-Lösung + 10 ccm m/150 Phosphatgemisch + 10 ccm Katalaseglykokollösung.					
0	23,9	—	23,1	—	—
10	10,0	0,0378	14,8	0,0193	51
20	5,0	0,0340	10,8	0,0165	49
30	2,7	0,0316	8,5	0,0145	46
40	1,8	0,0281	6,4	0,0139	50
					49
In Phosphatgemisch aufbewahrt (Kontrolle). 25 ccm etwa n/50 H_2O_2-Lösung + 10 ccm Glykokollösung + 10 ccm Katalasephosphatlösung.					
0	23,9	—	23,1	—	—
10	9,7	0,0392	12,3	0,0274	70
20	4,7	0,0353	7,2	0,0253	72
30	2,7	0,0316	4,5	0,0237	75
40	1,7	0,0287	3,3	0,0211	74
					73

Versuch 2.

Der Einfluß des α-Alanins.

2,0 g α-Alanin wurden in 400 ccm m/150 Phosphatgemisch gelöst (α-Alaninlösung). Je 0,8 ccm Ferment wurden mit 200 ccm α-Alaninlösung (Katalase-α-Alaninlösung) und mit 200 ccm m/150 Phosphatgemisch (Katalasephosphatlösung) versetzt. Die beiden Lösungen wurden sofort und nach etwa 24stündigem Aufbewahren im Eisschrank untersucht. Die Wasserstoffionenkonzentration betrug bei beiden p_H = etwa 7,0.

Tabelle L.

Zeit in Minuten	Sofort untersucht		Nach 24 Stunden		$\frac{K'}{K}$
	$a - x$ ccm	K	$a - x$ ccm	K'	%
In α-Alanin aufbewahrt. 25 ccm etwa n/50 H_2O_2-Lösung + 10 ccm m/150 Phosphatgemisch + 10 ccm Katalase-α-Alaninlösung.					
0	24,7	—	24,2	—	—
10	10,5	0,0372	14,5	0,0223	60
20	5,0	0,0347	9,8	0,0196	56
30	2,6	0,0326	7,5	0,0170	52
40	1,4	0,0312	5,0	0,0171	55
					56
In Phosphatgemisch aufbewahrt (Kontrolle). 25 ccm etwa n/50 H_2O_2-Lösung + 10 ccm α-Alaninlösung + 10 ccm Katalasephosphatlösung.					
0	24,7	—	24,2	—	—
10	10,5	0,0372	13,6	0,0250	67
20	5,2	0,0338	8,2	0,0235	70
30	2,7	0,0321	3,8	0,0207	64
40	1,5	0,0304	3,7	0,0204	67
					67

Wie aus den Tabellen ersichtlich ist, üben Glykokoll und α-Alanin keine Schutzwirkung auf die verdünnte Katalaselösung aus, sondern wirken etwas schädigend ein.

Versuch 3.

Der Einfluß des Harnstoffs.

4,0 g Harnstoff wurden in 400 ccm m/150 neutralem Phosphatgemisch gelöst (Harnstofflösung). Je 0,8 ccm Ferment wurden mit 200 ccm Harnstofflösung (Katalase-Harnstofflösung) und mit 200 ccm m/150 Phosphatgemisch (Katalase-Phosphatlösung) versetzt, und die Lösungen wurden sofort und nach etwa 24stündigem Aufbewahren im Eisschrank untersucht. Die Wasserstoffionenkonzentration war bei beiden p_H = etwa 7,0.

Tabelle LI.

Zeit in Minuten	Sofort untersucht $a - x$ ccm	Sofort untersucht K	Nach 24 Stunden $a - x$ ccm	Nach 24 Stunden K'	$\frac{K'}{K}$ %
In Harnstoff aufbewahrt. 25 ccm etwa n/50 H_2O_2-Lösung + 10 ccm m/150 Phosphatgemisch + 10 ccm Katalaseharnstofflösung.					
0	23,2	—	22,6	—	—
10	9,8	0,0374	11,6	0,0290	78
20	4,8	0,0342	6,5	0,0271	79
30	2,5	0,0323	4,0	0,0251	78
40	1,4	0,0305	2,5	0,0239	78
					78
In Phosphatgemisch aufbewahrt (Kontrolle). 25 ccm etwa n/50 H_2O_2-Lösung + 10 ccm Harnstofflösung + 10 ccm Katalasephosphatlösung.					
0	23,2	—	22,6	—	—
10	9,4	0,0392	11,7	0,0286	73
20	4,6	0,0351	6,9	0,0258	74
30	2,3	0,0335	4,0	0,0251	75
40	1,3	0,0313	2,8	0,0227	73
					74

Wie ersichtlich ist, verhält sich Harnstoff fast gleich wie Phosphatgemisch allein, er schädigt nicht, sondern scheint sogar eine allerdings nur geringe Schutzwirkung auszuüben. Hier wurde Harnstoff als eine 1 proz. Lösung angewandt. Bei 0,5 % Lösung wurden ebenfalls fast gleiche Resultate gewonnen.

Außerdem habe ich das Ferment in Gummi arabicum — Gummi arabicum (1 gepulvert) *Kahlbaum* — einen Tag aufbewahrt und dessen Schutzwirkung untersucht, aber die Resultate waren negativ, vielmehr schädigend beeinflussend.

Zusammenfassung.

Die wichtigsten Ergebnisse meiner Versuche lassen sich in folgender Weise zusammenfassen:

Zur Reinigung der Blutkatalase ist das Chloroform als ein geeignetes Mittel zu bewerten. Wie in Abschnitt I ausführlich beschrieben wurde, behalten die durch Chloroform gereinigten Lösungen unter den geeigneten Bedingungen etwa 70 % bei einem Pulver, etwa 80 % bei einem anderen Pulver und etwa 80 % ursprünglicher Wirksamkeit bei frischen Blutkörperchen. Die absolute Wirksamkeit der gereinigten Lösungen ist verschieden und abhängig von der Wirksamkeit der Ausgangslösungen. Der Trockenrückstand und der Stickstoffgehalt der gereinigten Lösungen sind bedeutend geringer im Vergleich zu den Ausgangslösungen. Besonders die Verminderung des Stickstoffs ist auffallend, und zwar enthalten die gereinigten Lösungen nur etwa

2% N der Ausgangslösungen. Die gereinigten Lösungen sind klar und zeigen einen schwach gelben Ton. Die gereinigten Lösungen sind wochenlang haltbar, wenn man dieselben mit einigen Tropfen Chloroform versetzt und im Eisschrank sorgfältig aufbewahrt. Die Bedingungen der Anwendung der Chloroformmethode wurden genau in den betreffenden Abschnitten beschrieben. Nur ein Punkt ist hier nochmals hervorzuheben: Um gute Resultate zu erhalten, ist es notwendig, eine passende Schüttelungszeit zu wählen. Denn die Katalase bleibt unabhängig von der Hämoglobinfällung anfangs in der Lösung zurück, geht aber schließlich in den Niederschlag über. Folglich kann durch längere Schüttelung eine stickstoffärmere Lösung erhalten werden. Jedoch muß man bei zu langer Schüttelung mit weiteren Verminderungen der Wirksamkeit rechnen. Als Ausgangsmaterial sind die frischen Blutkörperchen vorzuziehen. Blutpulver ist zwar monatelang haltbar und immer gleich brauchbar, aber an absoluter Wirksamkeit stehen diese Pulver dem frischen Blut nach, weil sie beim Trocknen und besonders in meinem Fall bei der Dialyse einen gewissen Teil der Wirksamkeit schon vorher verlieren. Tatsächlich sind die aus frischen Blutkörperchen gereinigten Lösungen viel wirksamer im Vergleich zu ihrem Stickstoffgehalt als diejenigen aus Pulver gereinigten. Bei Benutzung von frischen Blutkörperchen ist es zweckmäßig, dieselben von der Waschflüssigkeit möglichst zu befreien und als 10proz. in destilliertem Wasser zu hämolysieren. Was die Menge des Chloroforms angeht, so genügt $^1/_5$ Teil der Ausgangslösung. Die durch Chloroform gereinigten Lösungen sind zwar sehr arm an Stickstoff und zeigen gleichzeitig eine starke Wirksamkeit, aber diese Lösungen sind natürlich noch nicht als endgültig gereinigte Katalase zu betrachten, weil die Substanzen, die durch Chloroform nicht angegriffen werden können, in den Lösungen zurückbleiben.

Zur weiteren Reinigung sind die Adsorption mit dreibasischem Calciumphosphat und das Eluieren mit verdünntem zweibasischen Natriumphosphat mit Erfolg anzuwenden. Die Handhabung derselben wird im Abschnitt III beschrieben. Also durch die Adsorption und das Eluieren können die durch Chloroform gereinigten Lösungen weiter von dem beigemengten Stickstoff befreit werden, bei gleichzeitiger Beibehaltung der verhältnismäßig starken Wirksamkeit. In bezug auf die Entfernung der beigemengten Salze habe ich leider genaue Nachforschungen unterlassen. Ich kann hier nur sagen, daß das Kochsalz mit Hilfe der Adsorptionsmethode entfernt werden kann.

Die zur Adsorption nötigen Mengen des $(PO_4)_2Ca_3$ sind bei den verschiedenen durch Chloroform gereinigten Lösungen nicht immer gleich. Es ist daher zweckmäßig, im Vorversuche die brauchbarsten Mengen zu bestimmen und die kleinste davon zu benutzen. Das als

Eluens angewendete zweibasische Natriumphosphat wird als m/150 Lösung benutzt, und die Menge derselben ist gleich der ursprünglich durch Chloroform gereinigten Lösung. Die Dauer der eluierenden Behandlung beträgt 15 Minuten. Damit wird die Katalase unter den oben beschriebenen Bedingungen zum großen Teil in die Lösung übergeführt. Die in solcher Weise erhaltenen Elutionen sehen wasserklar aus und bleiben wochenlang in solchem Zustande, ohne dabei eine merkbare Abschwächung der Wirksamkeit zu zeigen, wenn sie mit einbasischem Kaliumphosphat genau neutralisiert, mit einigen Tropfen Chloroform versetzt und im Eisschrank aufbewahrt werden.

Die gereinigten Lösungen zeigen, wie es aus den Versuchen im Abschnitt III deutlich hervorgeht, noch einen sehr geringen Stickstoffgehalt und weisen eine sehr schwache, aber noch merkbare Trübung mit Sulfosalicylsäure auf. Aber ich glaube mindestens auf Grund meiner Versuche das schwere Problem der Entfernung des begleitenden Eiweißes bei gleichzeitiger Beibehaltung der starken Fermentwirkung bis zu einem gewissen Grade gelöst zu haben.

Die Frage, ob die Katalase selbst eine eiweißähnliche Substanz ist, ist noch nicht entschieden. *Waentig* und *Steche*[1]) haben die eiweißähnliche Natur der Katalase betont. Meine Erfahrungen machen es allerdings wahrscheinlich, daß man mit fortschreitender Reinigung zu einem ganz eiweißfreien Präparat gelangen wird. Diese Auffassung, zu der meine Beobachtungen drängen, ist auch im Einklang mit den Befunden, die *Willstätter* bei anderen Enzymen erhalten hat. Diese neuere Entwicklung rechtfertigt die seit Jahrzehnten von *Jacoby* vertretene Ansicht, daß kein Beweis der Eiweißreaktion der Enzyme vorhanden ist. Zu dieser Anschauung gelangte er bereits, als er 1900 die Aldehydase der Leber[2]) in wirksamer Form isolierte, ohne daß noch Eiweißreaktionen im Präparat nachweisbar waren. Sein Resultat wurde auch bereits unter Anwendung von Adsorptionsmethoden gewonnen, wenn auch natürlich damals die Methode noch primitiver war.

In bezug auf das Adsorptionsverfahren mit frisch gefälltem dreibasischem Calciumphosphat ist Genaueres in Abschnitt II angeführt worden. Die Beobachtungen wurden hauptsächlich bei einem Pulver, welches aus Pferdeblutkörperchen herstammt, gemacht. Die Ergebnisse lassen sich in folgender Weise zusammenfassen:

Die Katalase wird gemeinsam mit dem Hämoglobin durch $(PO_4)_2Ca_3$ aus der Blutlösung adsorbiert, und wenn das Verhältnis der Blutlösung zum $(PO_4)_2Ca_3$ gut gewählt ist, wird die Katalase bis zu einem gewissen Grade vom Hämoglobin befreit. Diese günstigen Verhältnisse

[1]) *Waentig* und *Steche*, Zeitschr. f. phys. Chem. **88**. 1913.
[2]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **80**. 1900.

sind bei Anwendung der aus Pferdeblutpulver hergestellten Lösungen deutlich beobachtet worden.

Die vollständig adsorbierte Katalase und Hämoglobin werden dem Adsorbens mit Wasser nicht wieder entzogen.

Für die Adsorption genügt als Kontaktdauer von $(PO_4)_2Ca_3$ und Blutlösung 10 Minuten.

Bei 10 Minuten Kontaktdauer zeigen die adsorbierten Katalasenmengen keine merkbaren Unterschiede im Bereiche der Temperatur von 2 bis 30° C.

Das Kochsalz scheint die Adsorption zu erschweren. Zweibasisches Natriumphosphat zeigt eine deutliche Hemmung der Adsorption.

Die adsorbierte Katalase gemeinsam mit Hämoglobin kann am besten durch verdünnte zweibasische Natriumphosphatlösung wieder frei gemacht werden. Wenn die Katalase bei der Adsorption bis zu einem gewissen Grade vom Hämoglobin befreit wird, so gelingt es hier deutlich, eine hämoglobinärmere Fermentlösung zu erhalten.

Die Eluierung wird etwas erschwert durch Verlängerung der Kontaktdauer und durch Vermehrung der $(PO_4)_2Ca_3$-Menge.

Die adsorbierte Katalase, von der Mutterlauge befreit, mit Wasser gewaschen und in demselben aufbewahrt, scheint weniger beständig zu sein als diejenige, die in Mutterlauge aufbewahrt wird. Die erstere zeigt durch Trocknen eine noch erheblichere Abschwächung der Wirksamkeit.

Ein kleiner Teil der adsorbierten Katalase bleibt immer im Adsorbens zurück, trotz mehrmaliger Eluierung; es scheint schwierig zu sein, die adsorbierte Katalase quantitativ zu extrahieren.

In bezug auf die bei Pulverlösungen beobachtete Tatsache, daß die Katalase durch Adsorption vom Hämoglobin bis zu einem gewissen Grade befreit wird, habe ich bei Lösungen von frischen Kaninchenblutkörperchen leider keine genügenden Erfahrungen, um einen endgültigen Schluß zu ziehen. Doch scheint es mir, daß solche Resultate, wie bei Pulverlösung, hier nicht deutlich zum Vorschein kommen.

Die praktische Handhabung der Adsorption scheint nicht so einfach zu sein. Das Adsorbens läßt sich immer in gleicher Weise herstellen, ebenso die Arbeitsbedingungen. Die Hauptschwierigkeiten gehen aus den Fermentlösungen hervor. Als ein schwieriges Moment muß die Verschiedenheit des kolloidalen Zustandes der verschiedenen Fermentlösungen und die Verschiedenheit der Beimengungen angesehen werden. Als Beispiel dient uns die Tatsache, daß von dem zu Adsorptionszwecken benutzten $(PO_4)_2Ca_3$ bei gereinigten Lösungen viel kleinere Mengen genügen, als bei unreinen Lösungen (s. Abschnitt III). Daraus geht hervor, daß die Beimengungen die Adsorption beeinflussen. Auf jeden Fall scheint es unmöglich, zurzeit eine end-

gültige Darstellung der optimalen Adsorptionsbedingungen zu bringen. Das wird nur dann möglich sein, wenn Fermente rein von allen beigemengten organischen und anorganischen Substanzen erhalten worden sind.

Die als Adsorbens benutzte $(PO_4)_2Ca_3$-Suspension habe ich gewöhnlich alle drei Wochen neu hergestellt, aber die Adsorptionsfähigkeit ist auch noch in etwa fünf Wochen nicht merkbar verändert. Das fertig käufliche $(PO_4)_2Ca_3$ (reines *Kahlbaum*-Präparat) war auch brauchbar, jedoch habe ich mit diesem Präparat nur wenig Erfahrungen. Im allgemeinen macht die Herstellung des frischen $(PO_4)_2Ca_3$ keine Schwierigkeiten.

Im letzten Abschnitt habe ich einige Eigenschaften der gereinigten Lösung untersucht und dabei folgende Ergebnisse erhalten.

Die gereinigte Katalase verliert etwa 20% ihrer Wirksamkeit nach Erwärmung während 30 Minuten bei etwa 45°C, zum größten Teil bei etwa 55°C und fast vollständig bei 65°C.

Die Katalase ist im verdünnten Zustande wenig beständig, sowie bei Verdünnung mit destilliertem Wasser und auch mit neutralem Phosphatgemisch. Glykokoll und α-Alanin üben keinen schützenden Einfluß gegenüber der Unbeständigkeit der verdünnten Katalase aus, sondern wirken schädigend. Harnstoff verhält sich wie Phosphatgemisch allein und scheint sogar eine geringe Schutzwirkung auszuüben.

Isolierungsversuche mit Soja-Agglutinin und Antiagglutinin.

Von

Kyoyetsuro Fujiwara aus Niigata (Japan).

(Aus dem biochemischen Laboratorium des Krankenhauses Moabit in Berlin.)

(Eingegangen am 5. Juni 1923.)

Die ersten Untersuchungen über die Wirkungen von Sojaextrakten auf den tierischen Organismus und über das Schicksal der Sojaurease im tierischen Organismus wurden im hiesigen Laboratorium von *Margarete Falk*[1]) ausgeführt. Später haben dann *Carnot*, *Gérard* und *Moissonier*[2]) diese Frage weiterbearbeitet. Bei Untersuchungen über den Einfluß der Sojaurease auf den Organismus beobachtete dann *Alfred Lublin*[3]), daß Sojapräparate schon in sehr starken Verdünnungen rote Blutkörperchen agglutinieren. Auf Veranlassung von Herrn Prof. *Jacoby* habe ich diese Eigenschaft der Sojapräparate dazu benutzt, um die wirksamen Bestandteile etwas weiter zu isolieren.

Wenn man auch vorläufig noch nicht weiß, ob und inwieweit die Urease dem Agglutinin der Soja nahesteht, so war es doch von Interesse, dem leicht zu studierenden Agglutinationsphänomen nachzugehen. Das war um so wünschenswerter, als das hiesige Institut im Anschluß an die weit zurückliegenden Untersuchungen von *M. Jacoby* schon lange mit der Ausarbeitung von Isolierungsmethoden für Toxine und überhaupt von Antigenen, aber auch von Antitoxinen beschäftigt ist.

Als Ausgangsmaterial wurde ein Präparat gewählt, welches bereits eine teilweise Reinigung hinter sich hatte. Die Sojabohnen waren so, wie *Jacoby* und *Sugga* es beschrieben hatten, in einer Kaffeemühle zermahlen und im Mörser zerrieben worden. Das so gewonnene Mehl war gehörig mit Petroläther entfettet worden. Das Pulver wurde dann direkt zu den Versuchen verwandt, ohne den weiteren Isolierungsmaßnahmen nach

---

[1]) Diese Zeitschr. **59**, 1914.

[2]) Ann. de l'Inst. Pasteur **35**, 1—42, 1921, Nr. 1.

[3]) Arch. f. exper. Path. u. Pharm. **92**, H. 4—6, 1922.

Jacoby und *Sugga* unterworfen zu werden. Daher war unser Ausgangsmaterial auch nur unvollkommen in Wasser löslich.

Für meine Versuche brachte ich immer 0,5 g in 100 ccm 0,85 proz. Kochsalzlösung. Da sich diese Menge nicht ganz löste, wurde immer nach 30 Minuten filtriert und das Filtrat zu den weiteren Versuchen verwandt. Durch besondere Versuche wurde sichergestellt, daß dabei alles Agglutinin in Lösung geht. Wenigstens war es nicht möglich, aus dem Rückstand durch weiteres Auswaschen mit Kochsalzlösung noch mehr Agglutinin zu extrahieren. Wieviel Agglutinin an Gewicht in der Lösung ist, wurde nicht bestimmt, sondern nur auf die Wirksamkeit Rücksicht genommen. Die angegebenen Zahlen haben jedoch vollgültigen Vergleichswert. Der wirkliche Agglutiningehalt der Lösungen ist natürlich wesentlich geringer.

Agglutination der roten Blutkörperchen durch die Sojaextrakte.

Als zu agglutinierende Blutkörperchen wurden immer dreimal gewaschene 5proz. Kaninchenblutkörperchen benutzt, die Agglutination wurde in folgender Weise geprüft. Es wurden eine Reihe Verdünnungen der zu prüfenden Lösung so hergestellt, daß der Inhalt jedes folgenden Gläschens immer doppelt so verdünnt war wie der des vorhergehenden Gläschens. Im ersten Glase ist also 1 ccm Sojaextrakt von 0,5 %, im zweiten von 0,25 %, im dritten von 0,125 %, im vierten von 0,0625 %, im fünften von 0,0312 %, im sechsten von 0,0156 %, im siebenten von 0,0078 %, im achten von 0,0039 %. Aus jedem Gläschen werden je 2 Tropfen auf eine Reihe von Uhrschälchen gebracht. Dazu fügt man 2 Tropfen der 5proz. Blutkörperchenaufschwemmung aus Kaninchenblut und mischt durch. Nach einer Stunde wird das Resultat abgelesen.

Röhrchennummer	1	2	3	4	5	6	7	8
%-Gehalt von Soja	0,5	0,25	0,125	0,0625	0,0312	0,0156	0,0078	0,0039
1. Versuch	+++	+++	+++	++	++	+	±	—
2. „	+++	+++	++	++	++	++	+	—
3. „	+++	+++	+++	++	++	+	—	—
4. „	+++	+++	++	++	+	+	+	—
5. „	+++	+++	+++	+++	++	+	+	—

+++ bedeutet sehr starke Agglutinatoin, ++ starke, + mäßige, — keine Agglutination.

Wie aus der Tabelle, die fünf zu verschiedenen Zeiten angeführte Versuche zusammenfaßt, zu ersehen ist, bewirkt Sojaextrakt schon in sehr starker Verdünnung (0,0156 bis 0,0078 %), d. h. in 6400 bis 12800facher Verdünnung noch deutliche Agglutination der Kaninchenblutkörperchen.

Adsorptionsversuche.

Über die Adsorption von Toxinen, anderen Antigenen und Antikörpern ist noch nicht viel gearbeitet worden[1]). Nur auf dem Gebiete der Fermente liegen zahlreiche und wertvolle Angaben über Adsorptionsversuche, namentlich die umfangreichen Untersuchungen *Willstätters* vor. Um die Adsorbierbarkeit des Sojaagglutinins zu prüfen, habe ich als Adsorptionsmittel Kaolin, Aluminiumhydroxyd (halogen- und schwefelfrei, *Kahlbaum*) und frisch bereitetes, dreibasisches Calciumphosphat benutzt. Immer wurden 20 ccm 0,5proz. filtrierter Sojaextrakt in physiologischer Kochsalzlösung mit einer bestimmten Menge des Adsorptionsmittels zusammen in ein Zentrifugenglas gebracht. Die Gläser wurden gut durchgemischt und die Gemische nach 30 Minuten zentrifugiert. Die völlig klare Flüssigkeit wurde abpipettiert und auf ihre agglutinierende Kraft geprüft.

Kaolin.

Röhrchennummer	1	2	3	4	5	6	7	8
			I.					
1. (10,0 ccm Extrakt + 2,0 g Kaolin)	—	—	—	—	—	—	—	—
2. (10,0 „ „ + 1,5 g „)	—	—	—	—	—	—	—	—
3. (10,0 „ „ + 1,0 g „)	—	—	—	—	—	—	—	—
4. (10,0 „ „ + 0,5 g „)	+++	+++	++	++	+	+	—	—
Kontrolle (nur Extrakt)	+++	+++	+++	++	++	+	±	—
			II.					
1. (10,0 ccm Extrakt + 2,0 g Kaolin)	—	—	—	—	—	—	—	—
2. (10,0 „ „ + 1,5 g „)	—	—	—	—	—	—	—	—
3. (10,0 „ „ + 1,0 g „)	—	—	—	—	—	—	—	—
4. (10,0 „ „ + 0,5 g „)	+++	+++	++	+	+	+	+	—
Kontrolle (Sojaextrakt)	+++	+++	++	++	++	++	+	—

10 ccm Extrakt werden also durch 1,5 g Kaolin vollkommen adsorbiert, durch 1,0 g fast vollkommen, durch 0,5 g Kaolin wird der Extrakt kaum adsorbiert.

[1]) *Edgard Zunz*, Recherches sur l'adsorption des toxines, des lysines et de leurs anticorps par l'acide silicique. — Zeitschr. f. Immunitätsf. u. exper. Therap. **19**, 326, 1913, H. 3. Dort Hinweise auf *L. Jaqué* und *E. Zunz*, Arch. internat. de Physiol. **8**, 227—270, 1909; Bull. de l'Acad. roy. de Med. de Belgique 4. Série, **24**, 691—718, 1910. Ferner *Rakusin*, Über das Verhalten der Proteine, Fermente, Toxine und Sera gegen Adsorption mittels Aluminiumhydroxyd; Zeitschr. f. Immunitätsf. u. exper. Therap. **34**, H. 3, 1922.

Aluminiumhydroxyd.

Anordnung ganz wie bei den Kaolinversuchen.

Röhrchennummer	1	2	3	4	5	6	7	8
				I.				
1. (10 ccm Extrakt + 2,0 g Aluminiumhydroxyd) . .	—	—	—	—	—	—	—	—
2. (10 ccm Extrakt + 1,5 g Aluminiumhydroxyd) . .	±	—	—	—	—	—	—	—
3. (10 ccm Extrakt + 1,0 g Aluminiumhydroxyd) . .	++	++	+	+	±	—	—	—
4. (10 ccm Extrakt + 0,5 g Aluminiumhydroxyd) . .	+++	+++	++	+	+	—	—	—
Kontrolle (Sojaextrakt) . .	+++	+++	+++	++	++	+	—	—
				II.				
1. (10 ccm Extrakt + 2,0 g Aluminiumhydroxyd) . .	—	—	—	—	—	—	—	—
2. (10 ccm Extrakt + 1,5 g Aluminiumhydroxyd) . .	+	+	+	—	—	—	—	—
3. (10 ccm Extrakt + 1,0 g Aluminiumhydroxyd) . .	+++	+++	++	++	+	+	—	—
4. (10 ccm Extrakt + 0,5 g Aluminiumhydroxyd) . .	+++	+++	++	++	+	+	+	—
Kontrolle (Sojaextrakt) . .	+++	+++	++	++	+	+	+	—

2 g Aluminiumhydroxyd adsorbiert also 10 ccm Sojaextrakt vollständig, 1,5 g aber bereits unvollkommen, kleinere Mengen sind kaum oder gar nicht wirksam.

Calciumphosphat.

Zur Herstellung des Calciumphosphats wurden 6,58 g Calciumchlorid und 7,6 g dreibasisches Natriumphosphat in je 100 ccm Wasser gelöst. Der beim Mischen der Lösungen entstehende reichliche, weiße Niederschlag wird bis zum Verschwinden der Chlorreaktion mit Wasser gewaschen und dann in 150 ccm physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmt.

Röhrchennummer	1	2	3	4	5	6	7	8
				I.				
1. 10 ccm Extr. + 3,0 ccm $Ca_3(PO_4)_2$	—	—	—	—	—	—	—	—
2. 10 „ „ + 2,0 „ $Ca_3(PO_4)_2$	+	+	—	—	—	—	—	—
3. 10 „ „ + 1,0 „ $Ca_3(PO_4)_2$	+++	++	++	+	+	+	+	—
4. 10 „ „ + 0,5 „ $Ca_3(PO_4)_2$	+++	++	++	+	+	+	+	—
Kontrolle (Sojaextrakt)	+++	+++	+++	+++	++	+	+	—
				II.				
1. 10 ccm Extr. + 3,0 ccm $Ca_3(PO_4)_2$	—	—	—	—	—	—	—	—
2. 10 „ „ + 2,0 „ $Ca_3(PO_4)_2$	+	+	—	—	—	—	—	—
3. 10 „ „ + 1,0 „ $Ca_3(PO_4)_2$	+++	++	++	+	+	+	+	—
4. 10 „ „ + 0,5 „ $Ca_3(PO_4)_2$	+++	++	++	+	+	+	+	—
Kontrolle (Sojaextrakt)	+++	+++	+++	+++	++	+	+	—

3 ccm Calciumphosphataufschwemmung adsorbieren also 10 ccm Extrakt vollkommen, 2 ccm unvollkommen, kleinere Mengen kaum oder gar nicht.

Alle drei Adsorptionsmittel können also das Sojaagglutinin aus der Lösung entfernen. Jedoch ist die Wirkung immer von einer genügenden Menge des Adsorbens abhängig. Für die gleiche Agglutininmenge sind 1,5 g Kaolin, 2,0 g Aluminiumhydroxyd oder 3 ccm der Aufschwemmung von Calciumphosphat notwendig.

Elutionsversuche.

Um zu prüfen, ob das adsorbierte Agglutinin aus den Niederschlägen eluiert werden kann, wurden immer je 20 ccm Extrakt mit den Adsorbentien (Kaolin, Aluminiumhydroxyd, Calciumphosphat) gemischt. Nach hinreichender Einwirkung wird die Flüssigkeit abgegossen und der Bodensatz zunächst einmal mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen. Dann wird zu dem Rückstand Kochsalzlösung bis zum ursprünglichen Volumen zugefügt und das Gemisch durchgeschüttelt. Diese Mischung wird nun auf zwei Zentrifugengläser verteilt und nach der Markierung der oberen Flüssigkeitsgrenze zentrifugiert. Nach dem Abguß der Waschflüssigkeit wird das eine Glas mit dem Extraktionsmittel bis zur Marke aufgefüllt, die Kontrolle mit Kochsalzlösung. Man mischt, läßt die Gläser über Nacht im Eisschrank und zentrifugiert wiederum. Nachdem man die Flüssigkeiten neutralisiert hat, prüft man ihre Agglutinationswirkung.

Elutionsversuche mit Ammoniak.

Als Elutionsmittel diente n/200 Ammoniak. Die Verdünnung war mit physiologischer Kochsalzlösung hergestellt. Neutralisiert wurde mit n/10 Salzsäure.

		1	2	3	4	5	6	7	8
		I.							
	0,5 % Sojaextrakt	+++	+++	++	++	++	++	+	—
Adsorption	1. (10,0 ccm Extr. : 2,0 g Kaolin)	—	—	—	—	—	—	—	—
	2. (10,0 „ „ : 1,5 g „)	—	—	—	—	—	—	—	—
	3. (10,0 „ „ : 1,0 g „)	—	—	—	—	—	—	—	—
	4. (10,0 „ „ : 0,5 g „)	+++	+++	++	+	+	+	—	—
Elution	mit $\frac{n}{200}$ NH_3 1.	—	—	—	—	—	—	—	—
	2.	—	—	—	—	—	—	—	—
	3.	+	+	±	±	—	—	—	—
	4.	+	+	+	±	—	—	—	—
	mit NaCl 1.	—	—	—	—	—	—	—	—
	2.	—	—	—	—	—	—	—	—
	3.	+	+	—	—	—	—	—	—
	4.	+	+	—	—	—	—	—	—

			1	2	3	4	5	6	7	8
II.										
Adsorption	0,5 % Sojaextrakt		+++	+++	+++	++	++	+	±	—
	1. (10,0 ccm Extr. : 2,0 g Kaolin)		—	—	—	—	—	—	—	—
	2. (10,0 „ „ : 1,5 g „)		—	—	—	—	—	—	—	—
	3. (10,0 „ „ : 1,0 g „)		+	—	—	—	—	—	—	—
	4. (10,0 „ „ : 0,5 g „)		+++	+++	++	++	+	+	—	—
Elution	mit $\frac{n}{200}$ NH_3	1.	—	—	—	—	—	—	—	—
		2.	+	+	±	—	—	—	—	—
		3.	++	++	+	+	±	—	—	—
		4.	++	++	+	+	±	—	—	—
	mit NaCl	1.	—	—	—	—	—	—	—	—
		2.	+	+	—	—	—	—	—	—
		3.	++	++	+	±	—	—	—	—
		4.	++	++	+	—	—	—	—	—
III.										
Adsorption	0,5 % Sojaextrakt		+++	+++	+++	++	++	+	—	—
	1. (10,0 ccm Extrakt : 2,0 g Aluminiumhydroxyd) . .		—	—	—	—	—	—	—	—
	2. (10,0 ccm Extrakt : 1,5 g Aluminiumhydroxyd) . .		—	±	—	—	—	—	—	—
	3. (10,0 ccm Extrakt : 1,0 g Aluminiumhydroxyd) . .		++	++	+	+	±	—	—	—
	4. (10,0 ccm Extrakt : 0,5 g Aluminiumhydroxyd) . .		+++	+++	++	+	+	—	—	—
Elution	mit $\frac{n}{200}$ NH_3	1.	—	—	—	—	—	—	—	—
		2.	—	—	—	—	—	—	—	—
		3.	+	±	—	—	—	—	—	—
		4.	+	+	±	—	—	—	—	—
	mit NaCl	1.	—	—	—	—	—	—	—	—
		2.	—	—	—	—	—	—	—	—
		3.	—	—	—	—	—	—	—	—
		4.	±	—	—	—	—	—	—	—
IV.										
Adsorption	0,5 % Sojaextrakt		+++	+++	++	++	+	+	+	—
	1. (10,0 ccm Extrakt : 2,0 g Aluminiumhydroxyd) . .		—	—	—	—	—	—	—	—
	2. (10,0 ccm Extrakt : 1,5 g Aluminiumhydroxyd) . .		+	+	+	—	—	—	—	—
	3. (10,0 ccm Extrakt : 1,0 g Aluminiumhydroxyd) . .		+++	+++	++	++	+	+	—	—
	4. (10,0 ccm Extrakt : 0,5 g Aluminiumhydroxyd) . .		+++	+++	++	++	+	+	+	—
Elution	mit $\frac{n}{200}$ NH_3	1.	—	—	—	—	—	—	—	—
		2.	—	—	—	—	—	—	—	—
		3.	+	+	—	—	—	—	—	—
		4.	+	+	±	—	—	—	—	—
	mit NaCl	1.	—	—	—	—	—	—	—	—
		2.	—	—	—	—	—	—	—	—
		3.	—	—	—	—	—	—	—	—
		4.	±	±	—	—	—	—	—	—

			1	2	3	4	5	6	7	8
V.										
Adsorption	5 % Sojaextrakt		+++	+++	+++	++	+	+	+	—
	1. 10,0 ccm Extr. : 4,0 ccm $Ca_3(PO_4)_2$		—	—	—	—	—	—	—	—
	2. 10,0 „ „ : 3,0 „ $Ca_3(PO_4)_2$		—	—	—	—	—	—	—	—
	3. 10,0 „ „ : 2,0 „ $Ca_3(PO_4)_2$		+	+	—	—	—	—	—	—
	4. 10,0 „ „ : 1,0 „ $Ca_3(PO_4)_2$		++	++	++	+	+	—	—	—
Elution	mit NH_3	1.	+	—	—	—	—	—	—	—
		2.	+	+	—	—	—	—	—	—
		3.	+	+	+	+	—	—	—	—
		4.	+	—	—	—	—	—	—	—
	mit NaCl	1.	—	—	—	—	—	—	—	—
		2.	—	—	—	—	—	—	—	—
		3.	—	—	—	—	—	—	—	—
		4.	—	—	—	—	—	—	—	—
VI.										
Adsorption	5 % Sojaextrakt		+++	+++	+++	++	+	+	±	—
	1. 10,0 ccm Extr. : 4,0 ccm $Ca_3(PO_4)_2$		—	—	—	—	—	—	—	—
	2. 10,0 „ „ : 3,0 „ $Ca_3(PO_4)_2$		—	—	—	—	—	—	—	—
	3. 10,0 „ „ : 2,0 „ $Ca_3(PO_4)_2$		+	±	—	—	—	—	—	—
	4. 10,0 „ „ : 1,0 „ $Ca_3(PO_4)_2$		+++	+++	++	+	+	—	—	—
Elution	mit NH_3	1.	+	—	—	—	—	—	—	—
		2.	+	+	—	—	—	—	—	—
		3.	+	+	+	—	—	—	—	—
		4.	+	—	—	—	—	—	—	—
	mit NaCl	1.	—	—	—	—	—	—	—	—
		2.	—	—	—	—	—	—	—	—
		3.	—	—	—	—	—	—	—	—
		4.	—	—	—	—	—	—	—	—

Durch n/200 Ammoniak wird also das Agglutinin eluiert, aber nicht sehr erheblich. Für 10 ccm eines 0,5 proz. Sojaextraktes läßt sich das Agglutinin am besten eluieren nach Behandlung mit 1,0 oder 0,5 g Kaolin, 0,5 g Aluminiumhydroxyd oder 2,0 ccm Calciumphosphat. Aus dem Kaolinadsorbat wird das Agglutinin aber auch durch Kochsalzlösung eluiert.

Elutionsversuche mit sekundärem Natriumphosphat.

Zur Elution wurde m/150 Na_2HPO_4 benutzt. Die Verdünnung wurde aus m/15 Lösung durch physiologische Kochsalzlösung bereitet. Vor der Agglutinationsprüfung wurde mit m/15 KH_2PO_4 neutralisiert. (Vgl. Tabelle S. 120.)

1 g Kaolin ist also für 10 ccm Sojaextrakt (0,5 %) die Dosis, aus welcher sekundäres Natriumphosphat am besten das Agglutinin eluieren kann. Jedoch wird aus dem Kaolinadsorbat auch durch Kochsalzlösung nicht viel schlechter das Agglutinin eluiert. Für Aluminiumhydroxyd und Calciumphosphat sind die entsprechenden Dosen 1,0 g und 2,0 ccm. Diese Dosen sind optimale Dosen. Bei diesen Adsorbentien ist Kochsalzlösung ohne eluierende Wirkung.

		I 1	I 2	I 3	I 4	I 5	I 6	I 7	I 8	II 1	II 2	II 3	II 4	II 5	II 6	II 7	II 8
Adsorption	0,5% Sojaextrakt	+++	+++	+++	++	++	+	+	—	+++	+++	+++	++	++	+	—	—
	1. (10,0 ccm Extrakt : 2 g Kaolin)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	2. (10,0 „ „ + 1 g „)	±	—	—	—	—	—	—	—	+	—	—	—	—	—	—	—
	3. (10,0 „ „ + 0,5 g „)	++	++	++	+	+	—	—	—	+++	++	++	+	±	—	—	—
Elution mit Na_2HPO_4	1.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	2.	++	+	+	±	—	—	—	—	+	+	+	—	—	—	—	—
	3.	+	+	+	±	—	—	—	—	+	+	—	—	—	—	—	—
Elution mit NaCl	1.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	2.	+	+	±	—	—	—	—	—	+	±	±	—	—	—	—	—
	3.	+	+	±	—	—	—	—	—	+	±	—	—	—	—	—	—
Adsorption	0,5% Sojaextrakt	+++	+++	++	++	+	+	—	—	+++	+++	+++	++	++	+	+	—
	1. (10,0 ccm Extr. : 2,0 Alum.-Hydroxyd)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	2. (10,0 „ „ : 1,0 „)	++	+	+	+	±	—	—	—	+++	+++	++	+	—	—	—	—
	3. (10,0 „ „ : 0,5 „)	+++	++	++	+	+	±	—	—	+++	+++	++	++	+	+	—	—
Elution mit Na_2HPO_4	1.	+	—	—	—	—	—	—	—	+	—	—	—	—	—	—	—
	2.	++	++	+	+	±	—	—	—	+++	++	+	+	—	—	—	—
	3.	++	+	+	±	—	—	—	—	++	+	+	—	—	—	—	—
Elution mit NaCl	1.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	2,	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	3.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Adsorption	0,5% Sojaextrakt	+++	+++	+++	+++	++	+	+	—	+++	+++	++	++	+	+	—	—
	1. (10,0 ccm Extrakt : 4,0 $Ca_3(PO_4)_2$)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	2. (10,0 „ „ : 3,0 $Ca_3(PO_4)_2$)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	3. (10,0 „ „ : 2,0 $Ca_3(PO_4)_2$)	+	+	—	—	—	—	—	—	+	+	—	—	—	—	—	—
	4. (10,0 „ „ : 1,0 $Ca_3(PO_4)_2$)	+++	+++	+++	+	+	—	—	—	+++	+++	++	+	+	—	—	—
Elution mit Na_2HPO_4	1.	+	—	—	—	—	—	—	—	+	—	—	—	—	—	—	—
	2.	+	+	±	—	—	—	—	—	+	+	±	—	—	—	—	—
	3.	++	+	+	+	—	—	—	—	++	+	+	+	—	—	—	—
	4.	+	+	—	—	—	—	—	—	+	+	—	—	—	—	—	—
Elution mit NaCl	1.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	2.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	3.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	4.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

		I 1	I 2	I 3	I 4	I 5	I 6	I 7	I 8	II 1	II 2	II 3	II 4	II 5	II 6	II 7	II 8
Adsorption	0,5% Sojaextrakt	+++	+++	+++	++	++	+	—	—	+++	+++	+++	++	+	+	—	—
	1. (10,0 ccm Extrakt : 2,0 g Kaolin)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	2. (10,0 „ „ : 1,0 „ „)	+	—	—	—	—	—	—	—	+	—	—	—	—	—	—	—
	3. (10,0 „ „ : 0,5 „ „)	+++	++	++	+	±	—	—	—	++	++	+	+	—	—	—	—
Elution mit KH_2PO_4	1.	—	—	—		—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	2.	+	—	—		—	—	—	—	+	+	—	—	—	—	—	—
	3.	±	—	—		—	—	—	—	+	—	—	—	—	—	—	—
Elution mit NaCl	1.	—	—	—		—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	2.	+	±	±		—	—	—	—	+	+	+	—	—	—	—	—
	3.	+	±	—		—	—	—	—	+	+	—	—	—	—	—	—
Adsorption	0,5% Sojaextrakt	+++	+++	+++	++	++	+	+	—	+++	+++	+++	+++	++	+	+	—
	1. (10,0 ccm Extr. : 2,0 g Alum.-Hydroxyd)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	2. (10,0 „ „ : 1,0 „ „)	+++	+++	++	+	—	—	—	—	++	+	+	±	—	—	—	—
	3. (10,0 „ „ : 0,5 „ „)	+++	+++	++	++	+	+	—	—	+++	++	+	+	+	+	—	—
Elution mit KH_2PO_4	1.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	2.	+	+	—	—	—	—	—	—	+	+	+	—	—	—	—	—
	3.	+	—	—	—	—	—	—	—	+	+	—	—	—	—	—	—
Elution mit NaCl	1.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	2.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	3.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Adsorption	0,5% Sojaextrakt	+++	+++	+++	+++	++	+	+	—	+++	+++	+++	++	+	+	+	—
	1. (10,0 ccm Extr. : 3,0 ccm $Ca_3(PO_4)_2$)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	2. (10,0 „ „ : 2,0 ccm „)	+	+	—	—	—	—	—	—	+	+	+	—	—	—	—	—
	3. (10,0 „ „ : 1,0 „ „)	+++	++	++	+	+	+	+	—	++	++	++	+	+	+	—	—
Elution mit KH_2PO_4	1.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	2.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	3.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Elution mit NaCl	1.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	2.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	3.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

Elutionsversuche mit primärem Kaliumphosphat.

Zur Elution wurde m/150 KH_2PO_4 benutzt. Die Verdünnung wurde aus m/15 Lösung durch physiologische Kochsalzlösung bereitet. Vor der Agglutinationsprüfung wurde mit m/15 Na_2HPO_4 neutralisiert. (Vgl. Tabelle S. 121.)

Das primäre Kaliumphosphat ist also erheblich weniger imstande, das Agglutinin zu eluieren als die alkalischen Elutionsmittel.

Die Elutionsversuche lehren uns also, daß das durch Kaolin, Aluminiumhydroxyd oder Calciumphosphat adsorbierte Agglutinin durch schwache Alkalien eluiert werden kann, während schwache Säure sehr wenig geeignet ist. Aus Kaolin kann das Agglutinin schon durch die physiologische Kochsalzlösung allein eluiert werden. Die Elution gelingt am besten, wenn man bei der Adsorption überschüssiges Adsorptionsmittel vermieden hat. Eine quantitative Elution gelingt auch bisher unter den günstigsten Bedingungen nicht. Vorläufig können wir auch den Grad der Elution noch nicht quantitativ ausdrücken.

Coctolabilität des Sojaagglutinins.

Es ist bekannt, daß viele Agglutinine durch Einwirkung höherer Temperaturen unwirksam werden. Deshalb habe ich geprüft, wie sich die Wirksamkeit von 0,5proz. Sojaextrakt nach dem Aufkochen verhält. Wie aus der Tabelle hervorgeht, wird die Agglutinationswirkung durch die Siedehitze zerstört.

	Sojaextrakt	1	2	3	4	5	6	7	8
I.	Kontrolle . . .	+++	+++	+++	++	+	+	+	—
	Gekocht	—	—	—	—	—	—	—	—
II.	Kontrolle . . .	+++	+++	+++	++	+	+	+	—
	Gekocht	—	—	—	—	—	—	—	—
III.	Kontrolle . . .	+++	+++	++	++	+	+	—	—
	Gekocht	—	—	—	—	—	—	—	—

Antisojasera.

Versuche über die Wirksamkeit des Antiserums.

Für Antiricin, Antiabrin usw. ist es bekannt, daß die durch die Phytoagglutinine bewirkte Agglutination durch immunisatorisch erzeugte Antikörper gehemmt oder verhindert wird. So war es möglich, daß man auch durch Injektion der agglutinierenden Sojaextrakte bei Tieren hemmende Antisera erhalten könnte. Deshalb wurden an zwei Kaninchen Versuche gemacht, welche diese Vermutung bestätigten.

Kaninchen Nr. 81, 1900 g, wurde Sojaextrakt siebenmal in steigenden Dosen (10 ccm 1 proz. Lösung — 20 ccm 2 proz. Lösung) in Pausen von 4 bis 9 Tagen subkutan injiziert. 8 Tage nach der letzten Injektion wurde das Blut entnommen und das Serum gewonnen. Dieses Serum wurde auf seine antiagglutinierende Kraft geprüft.

Zur Prüfung auf antiagglutinierende Kraft wurde Sojaextrakt mit der zu prüfenden Lösung verdünnt, da mir diese Methode die beste und empfindlichste schien. Man nimmt acht Reagenzröhrchen und füllt je 0,5 ccm von fünffach verdünntem Antiserum in das zweite bis achte Gläschen. Nun bringt man 0,5 ccm Extrakt in Glas 1, dann ebenfalls 0,5 in Glas 2. Man mischt den Inhalt von Glas 2 gut durch und überträgt 0,5 ccm der Mischung in Glas 3 und so weiter bis Glas 8. Von jedem Glas bringt man zwei Tropfen auf ein Uhrglas, fügt zwei Tropfen 5 proz. Kaninchenblutkörperchenaufschwemmung hinzu und mischt durch. Nach einer Stunde liest man das Resultat ab.

Nr.	Soja-extrakt in %	I. Sojaextrakt, verdünnt mit 20 proz. Antiserum	I. Kochsalz	II. Sojaextrakt, verdünnt mit 20 proz. Antiserum	II. Kochsalz	III. Sojaextrakt, verdünnt mit 20 proz. Antiserum	III. Kochsalz	IV. Sojaextrakt, verdünnt mit 20 proz. Antiserum	IV. Kochsalz	V. Sojaextrakt, verdünnt mit 20 proz. Antiserum	V. Kochsalz
1.	0,5		+++		+++		+++		+++		+++
2.	0,25	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++	++	+++
3.	0,125	+++	+++	++	+++	+++	+++	++	++	++	++
4.	0,0625	—	++	—	+	—	++	—	++	—	+
5.	0,0312	—	+	—	+	—	+	—	+	—	+
6.	0,0156	—	+	—	+	—	+	—	+	—	+
7.	0,0078	—	+	—	+	—	+	—	±	—	±
8.	0,0039	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

Während man also bei Verdünnung mit Kochsalzlösung noch in Probe 7, also bei einer Verdünnung von 0,0078 % (12800 fach), die agglutinierende Wirkung nachweisen kann, ist bei Zusatz von Antiserum (20 %) die Agglutination nur bis Probe 3, also bis zur Verdünnung 0,125 % (800 fach), nachweisbar. Das Antiserum hat also erhebliche antiagglutinierende Wirkung. Da aber das 20 proz. Antiserum (fünffach verdünntes Serum) noch nicht gänzlich die Agglutinationswirkung von 0,5 % Sojaextrakt aufheben kann, mußten Versuche mit konzentrierterem Serum angestellt werden.

	1	2	3	4	5	6	7	8
I.								
Sojaextrakt mit 50 proz. Antiserum verdünnt		+++	—	—	—	—	—	—
Sojaextrakt mit reinem Antiserum verdünnt		—	—	—	—	—	—	—
Sojaextrakt mit Kochsalzlösung verdünnt	+++	+++	+++	++	+	+	+	—
II.								
Sojaextrakt mit 50 proz. Antiserum verdünnt		+++	±	—	—	—	—	—
Sojaextrakt mit reinem Antiserum verdünnt		±	—	—	—	—	—	—
Sojaextrakt mit Kochsalzlösung verdünnt	+++	+++	+++	++	+	+	+	—

Bei Anwendung von konzentrierterem Serum ist also die Antikörperwirkung sehr deutlich erkennbar.

Kaninchen Nr. 83, 2250 g, wurde Sojaextrakt fünfmal in steigender Dosis (10 ccm von 1 proz. Lösung — 20 ccm von 2 proz. Lösung) in Zwischenräumen von 5 bis 8 Tagen subkutan injiziert. 10 Tage nach der letzten Injektion wurde das Blut entnommen und das Serum dargestellt. Mit diesem Serum wurde wiederum die antiagglutinierende Wirksamkeit geprüft. Es wurde genau so vorgegangen, wie bei dem vorigen Serum. Die Ergebnisse sind aus der folgenden Tabelle zu erkennen.

Versuchsreihe	Prüfungslösung	1	2	3	4	5	6	7	8
I.	Sojaextrakt mit 20proz. Antiserum verdünnt . .		+++	++	+	—	—	—	—
	Sojaextrakt mit NaCl verdünnt (Kontrolle) . . .	+++	+++	+++	++	++	+	+	—
II.	Sojaextrakt mit 20proz. Antiserum verdünnt . .		+++	++	+	—	—	—	—
	Sojaextrakt mit NaCl verdünnt (Kontrolle) . . .	+++	+++	+++	++	++	+	+	—
III.	Sojaextrakt mit 20proz. Antiserum verdünnt . .		+++	++	+	—	—	—	—
	Sojaextrakt mit NaCl verdünnt (Kontrolle) . . .	+++	+++	+++	++	++	+	+	—
IV.	Sojaextrakt mit 20proz. Antiserum verdünnt . .		+++	++	+	—	—	—	—
	Sojaextrakt mit NaCl verdünnt (Kontrolle) . . .	+++	+++	+++	++	++	+	+	—
V.	Sojaextrakt mit 50proz. Antiserum verdünnt . .		++	+	—	—	—	—	—
	Sojaextrakt mit reinem Antiserum verdünnt . .		++	±	—	—	—	—	—
	Sojaextrakt mit NaCl verdünnt (Kontrolle) . . .	+++	+++	+++	+++	++	+	+	—
VI.	Sojaextrakt mit 50proz. Antiserum verdünnt . .		++	+	—	—	—	—	—
	Sojaextrakt mit reinem Antiserum verdünnt . .		++	—	—	—	—	—	—
	Sojaextrakt mit NaCl verdünnt (Kontrolle) . . .	+++	+++	+++	+++	++	+	+	—

Die Wirkung dieses Antiserums ist also etwas schwächer als die des anderen Serums. Sonst sind aber die Ergebnisse etwa die gleichen.

Es war nunmehr noch zu untersuchen, ob nicht etwa schon das Serum normaler, gesunder Kaninchen die Agglutination durch Sojaextrakt hemmt. Wie aus der folgenden Tabelle hervorgeht, ist das kaum der Fall. Die Hemmungswirkung der vorbehandelten Kaninchen gegenüber Sojaextrakt ist als immunisatorisch entstanden anzusehen.

Versuchsreihe	Prüfungslösung	1	2	3	4	5	6	7	8
I.	Sojaextrakt mit 20proz. Normalserum verdünnt .		+++	++	++	++	+	+	—
	Sojaextrakt mit 50proz. Normalserum verdünnt .		+++	+++	++	+	+	+	—
	Sojaextrakt mit reinem Normalserum verdünnt .		+++	+++	++	+	+	+	—
	Sojaextrakt mit NaCl verdünnt (Kontrolle) . . .	+++	+++	+++	++	+	+	+	—
II.	Sojaextrakt mit 20proz. Normalserum verdünnt .		+++	+++	+++	++	+	+	—
	Sojaextrakt mit 50proz. Normalserum verdünnt .		++	++	++	+	+	—	—
	Sojaextrakt mit reinem Normalserum verdünnt .		++	++	+	+	+	—	—
	Sojaextrakt mit NaCl verdünnt (Kontrolle) . . .	+++	+++	+++	+++	++	+	+	—
III.	Sojaextrakt mit 20proz. Normalserum verdünnt .		+++	+++	+++	++	+	+	—
	Sejaextrakt mit 50proz. Normalserum verdünnt .		+++	+++	++	++	+	+	—
	Sojaextrakt mit reinem Normalserum verdünnt .		+++	+++	++	++	+	+	—
	Sojaextrakt mit NaCl verdünnt (Kontrolle) . . .	+++	+++	+++	++	++	+	+	—

Über die Spezifität des Antisojaserums.

Als weitere Aufgabe ergab sich nun, festzustellen, ob das Sojaimmunserum für Soja insofern spezifisch ist, daß es nur dieses und nicht auch andere Agglutinine hemmt. Es wurde daher die Wirkung des Serums gegenüber Ricin-*Merck* (0,2 %), Phasin-*Merck* (0,5 %) und *Jack-bean* (0,5 %) geprüft. Die Extrakte wurden auch hier mit 0,85 proz. Kochsalzlösung hergestellt und vor dem Gebrauch einmal filtriert. Die Versuchsanordnung ist dieselbe wie in den anderen Versuchen.

Versuche mit Ricin.

Versuchsreihe	Prüfungslösung	1	2	3	4	5	6	7	8
I.	0,2proz. Ricin mit 20proz. Antiserum (81) verdünnt		++	+	+	—	—	—	—
	0,2proz. Ricin mit 50proz. Antiserum (81) verdünnt		++	+	±	—	—	—	—
	0,2proz. Ricin mit reinem Antiserum (81) verdünnt		+	+	—	—	—	—	—
	0,2proz. Ricin mit NaCl verdünnt (Kontrolle)	+++	++	++	++	+	—	—	—

Versuche mit Ricin. (Fortsetzung.)

Versuchsreihe	Prüfungslösung	1	2	3	4	5	6	7	8
II.	0,2proz. Ricin mit 20proz. Antiserum (81) verdünnt		++	+	+	—	—	—	—
	0,2proz. Ricin mit 50proz. Antiserum (81) verdünnt		++	+	±	—	—	—	—
	0,2proz. Ricin mit reinem Antiserum (81) verdünnt		++	+	±	—	—	—	—
	0,2proz. Ricin mit NaCl verdünnt (Kontrolle)	++	++	++	+	+	—	—	—
III.	0,2proz. Ricin mit 20proz. Antiserum (83) verdünnt		++	+	±	—	—	—	—
	0,2proz. Ricin mit 50proz. Antiserum (83) verdünnt		+	+	—	—	—	—	—
	0,2proz. Ricin mit reinem Antiserum (83) verdünnt		+	—	—	—	—	—	—
	0,2proz. Ricin mit NaCl verdünnt (Kontrolle)	++	++	+	+	+	—	—	—
IV.	0,2proz. Ricin mit 20proz. Antiserum (83) verdünnt		++	+	+	—	—	—	—
	0,2proz. Ricin mit 50proz. Antiserum (83) verdünnt		++	+	—	—	—	—	—
	0,2proz. Ricin mit reinem Antiserum (83) verdünnt		+	—	—	—	—	—	—
	0,2proz. Ricin mit NaCl verdünnt (Kontrolle)	++	++	+	+	+	—	—	—

Versuche mit Jack-bean.

Versuchsreihe	Prüfungslösung	1	2	3	4	5	6	7	8
I.	0,5proz. Jack-bean mit 20proz. Antirerum (81) verdünnt		+	—	—	—	—	—	—
	0,5proz. Jack-bean mit 50proz. Antiserum (81) verdünnt		—	—	—	—	—	—	—
	0,5proz. Jack-bean mit reinem Antiserum (81) verdünnt		—	—	—	—	—	—	—
	0,5proz. Jack-bean mit NaCl verdünnt (Kontrolle)	++	++	++	++	+	—	—	—
II.	0,5proz. Jack-bean mit 20proz. Antiserum (81) verdünnt		+	—	—	—	—	—	—
	0,5proz. Jack-bean mit 50proz. Antiserum (81) verdünnt		—	—	—	—	—	—	—
	0,5proz. Jack-bean mit reinem Antiserum (81) verdünnt		—	—	—	—	—	—	—
	0,5proz. Jack-bean mit NaCl verdünnt (Kontrolle)	++	++	++	+	+	—	—	—

Versuche mit Jack-bean. (Fortsetzung.)

Versuchsreihe	Prüfungslösung	1	2	3	4	5	6	7	8
III.	0,5proz. Jack-bean mit 20proz. Antiserum (83) verdünnt		±	—	—	—	—	—	—
	0,5proz. Jack-bean mit 50proz. Antiserum (83) verdünnt		—	—	—	—	—	—	—
	0,5proz. Jack-bean mit reinem Antiserum (83) verdünnt		—	—	—	—	—	—	—
	0,5proz. Jack-bean mit NaCl verdünnt (Kontrolle)	++	++	++	++	+	+	—	—
IV.	0,5proz. Jack-bean mit 20proz. Antiserum (83) verdünnt		±	—	—	—	—	—	—
	0,5proz. Jack-bean mit 50proz. Antiserum (83) verdünnt		—	—	—	—	—	—	—
	0,5proz. Jack-bean mit reinem Antiserum (83) verdünnt		—	—	—	—	—	—	—
	0,5proz. Jack-bean mit NaCl verdünnt (Kontrolle)	++	++	++	++	+	+	+	—

Versuche mit Phasin.

Versuchsreihe	Prüfungslösung	1	2	3	4	5	6	7	8
I.	0,5proz. Phasin mit 20proz. Antiserum (81) verdünnt		+	—	—	—	—	—	—
	0,5proz. Phasin mit 50proz. Antiserum (81) verdünnt		—	—	—	—	—	—	—
	0,5proz. Phasin mit reinem Antiserum (81) verdünnt		—	—	—	—	—	—	—
	0,5proz. Phasin mit NaCl verdünnt (Kontrolle)	++	++	++	++	+	—	—	—
II.	0,5proz. Phasin mit 20proz. Antiserum (81) verdünnt		+	—	—	—	—	—	—
	0,5proz. Phasin mit 50proz. Antiserum (81) verdünnt		—	—	—	—	—	—	—
	0,5proz. Phasin mit reinem Antiserum (81) verdünnt		—	—	—	—	—	—	—
	0,5proz. Phasin mit NaCl verdünnt (Kontrolle)	++	++	++	+	+	—	—	—
III.	0,5proz. Phasin mit 20proz. Antiserum (83) verdünnt		±	—	—	—	—	—	—
	0,5proz. Phasin mit 50proz. Antiserum (83) verdünnt		—	—	—	—	—	—	—
	0,5proz. Phasin mit reinem Antiserum (83) verdünnt		—	—	—	—	—	—	—
	0,5proz. Phasin mit NaCl verdünnt (Kontrolle)	++	++	++	++	+	—	—	—
IV.	0,5proz. Phasin mit 20proz. Antiserum (83) verdünnt		±	—	—	—	—	—	—
	0,5proz. Phasin mit 50proz. Antiserum (83) verdünnt		—	—	—	—	—	—	—
	0,5proz. Phasin mit reinem Antiserum (83) verdünnt		—	—	—	—	—	—	—
	0,5proz. Phasin mit NaCl verdünnt (Kontrolie)	++	++	++	++	+	—	—	—

Aus der Tabelle ist ersichtlich, daß Ricinagglutinin bis zu Glas 5 (0,0125% = 8000fache Verdünnung), das Jack-bean-Agglutinin bis zu Glas 7 (0,0078% = 12800fache Verdünnung), das Phasinagglutinin bis zu Glas 4 bis 5 (0,0625 bis 0,0312 = 1600- bis 3200fache Verdünnung) nachweisbar ist. Verdünnt man nun diese Extrakte mit Antisojaserum, so kommt es zu einer sehr erheblichen Abnahme des Agglutinins. Es wirkt dann erst das Ricinagglutinin in Glas 3 bis 4 (0,05 bis 0,025% = 2000- bis 4000fache Verdünnung) beim Zusatz von 20proz. Antiserum, im Glas 3 (0,05% = 2000fache Verdünnung) beim Zusatz von 50proz. Antiserum, in Glas 2 bis 3 (0,1 bis 0,05% = 1000 bis 2000fache Verdünnung) bei 100proz. Antiserum. Das Jack-bean-Agglutinin und das Phasinagglutinin wirkt sogar höchstens in Glas 2 beim Verdünnen mit 20proz. Antiserum, fast gar nicht bei stärkeren Konzentrationen des Antiserums. Man könnte nun aus diesen Versuchen schließen wollen, daß das immunisatorisch entstandene Sojaantiagglutinin auch gegen die anderen Agglutinine hemmend wirkt, also nicht spezifisch ist. Dieser Schluß wäre aber verfehlt. Denn die Agglutinine des Ricins, der Jackbohnen und des Phasins werden durch normales Serum ebenso stark gehemmt wie durch das Antisojaserum. Dagegen wird das Agglutinin der Soja durch normales Kaninchenserum fast gar nicht oder gar nicht gehemmt. Die antiagglutinierende Wirkung des Antisojaserums gegen Ricin, Jackbohnen und Phasin ist also nicht auf die Wirkung des immunisatorisch auftretenden Sojaagglutinins zurückzuführen. Diesem Antikörper kommt also eine gewisse Spezifität zu.

Die hemmende Wirkung des normalen Kaninchenserums gegen Ricin, Jack-bean und Phasin ist aus der folgenden Tabelle ersichtlich.

Versuchsreihe	Prüfungslösung	1	2	3	4	5	6	7	8
I.	0,2 proz. Ricin mit 20 proz. normalen Serum (a) verdünnt		++	+	—	—	—	—	—
	0,5 proz. Jack-bean mit 20 proz. normalen Serum (a) verdünnt		±	—	—	—	—	—	—
	0,5 proz. Phasin mit 20 proz. normalen Serum (a) verdünnt		+	—	—	—	—	—	—
	0,2 proz. Ricin mit 50 proz. normalen Serum (a) verdünnt		+	—	—	—	—	—	—
	0,5 proz. Jack-bean mit 50 proz. normalen Serum (a) verdünnt		—	—	—	—	—	—	—
	0,5 proz. Phasin mit 50 proz. normalen Serum (a) verdünnt		—	—	—	—	—	—	—
	0,2 proz. Ricin mit reinem normalen Serum (a) verdünnt		+	—	—	—	—	—	—
	0,5 proz. Jack-bean mit reinem normalen Serum (a) verdünnt		—	—	—	—	—	—	—
	0,5 proz. Phasin mit reinem normalen Serum (a) verdünnt		—	—	—	—	—	—	—

Versuchsreihe	Prüfungslösung	1	2	3	4	5	6	7	8
	0,2proz. Ricin mit 20proz. normalen Serum (*a*) verdünnt		++	+	—	—	—	—	—
	0,5proz. Jack-bean mit 20proz. normalen Serum (*a*) verdünnt		—	—	—	—	—	—	—
	0,5proz. Phasin mit 20proz. normalen Serum (*a*) verdünnt		+	—	—	—	—	—	—
	0,2proz. Ricin mit 50proz. normalen Serum (*a*) verdünnt		+	—	—	—	—	—	—
II.	0,5proz. Jack-bean mit 50proz. normalen Serum (*a*) verdünnt		—	—	—	—	—	—	—
	0,5proz. Phasin mit 50proz. normalen Serum (*a*) verdünnt		—	—	—	—	—	—	—
	0,2proz. Ricin mit reinem normalen Serum (*a*) verdünnt		+	—	—	—	—	—	—
	0,5proz. Jack-bean mit reinem normalen Serum (*a*) verdünnt		—	—	—	—	—	—	—
	0,5proz. Phasin mit reinem normalen Serum (*a*) verdünnt		—	—	—	—	—	—	—
	0,2proz. Ricin mit 20proz. normalen Serum (*b*) verdünnt		+	—	—	—	—	—	—
	0,5proz. Jack-bean mit 20proz. normalen Serum (*b*) verdünnt		+	—	—	—	—	—	—
	0,5proz. Phasin mit 20proz. normalen Serum (*b*) verdünnt		+	—	—	—	—	—	—
	0,2proz. Ricin mit 50proz. normalen Serum (*b*) verdünnt		+	—	—	—	—	—	—
III.	0,5proz. Jack-bean mit 50proz. normalen Serum (*b*) verdünnt		±	—	—	—	—	—	—
	0,5proz. Phasin mit 50proz. normalen Serum (*b*) verdünnt		+	—	—	—	—	—	—
	0,2proz. Ricin mit reinem normalen Serum (*b*) verdünnt		+	—	—	—	—	—	—
	0,5proz. Jack-bean mit reinem normalen Serum (*b*) verdünnt		—	—	—	—	—	—	—
	0,5proz. Phasin mit reinem normalen Serum (*b*) verdünnt		—	—	—	—	—	—	—
	0,2proz. Ricin mit 20proz. normalen Serum (*b*) verdünnt		+	—	—	—	—	—	—
	0,5proz. Jack-bean mit 20proz. normalen Serum (*b*) verdünnt		+	—	—	—	—	—	—
	0,5proz. Phasin mit 20proz. normalen Serum (*b*) verdünnt		+	—	—	—	—	—	—
	0,2proz. Ricin mit 50proz. normalen Serum (*b*) verdünnt		+	—	—	—	—	—	—
IV.	0,5proz. Jack-bean mit 50proz. normalen Serum (*b*) verdünnt		±	—	—	—	—	—	—
	0,5proz. Phasin mit 50proz. normalen Serum (*b*) verdünnt		±	—	—	—	—	—	—
	0,2proz. Ricin mit reinem normalen Serum (*b*) verdünnt		+	—	—	—	—	—	—
	0,5proz. Jack-bean mit reinem normalen Serum (*b*) verdünnt		—	—	—	—	—	—	—
	0,5proz. Phasin mit reinem normalen Serum (*b*) verdünnt		—	—	—	—	—	—	—

Anti-serum	Die zum Verdünnen von 0,5proz. Sojaextrakt gebrauchte Lösung	I. Agglutination 1	2	3	4	5	6	7	8	II. Agglutination 1	2	3	4	5	6	7	8
81	5fach verdünntes Antiserum		+++	+++	—	—	—	—	—		+++	++	—	—	—	—	—
	Abguß nach der Adsorption mit $Ca_3(PO_4)_2$		+++	+++	++	+	±	—	—		+++	+++	+++	++	+	—	—
	Die mit $^1/_{150}$ mol. Na_2HPO_4 extrahierte Lösung		+++	+++	++	—	—	—	—		+++	+++	+++	+	—	—	—
	Die mit $^3/_{150}$ mol. Na_2HPO_4 extrahierte Lösung		+++	+++	+	—	—	—	—		+++	++	+	+	—	—	—
	Die mit physiol. NaCl extrahierte Lösung		+++	+++	++	+	+	—	—		+++	+++	+++	+	+	—	—
83	5fach verdünntes Antiserum		+++	++	+	—	—	—	—		+++	++	+	—	—	—	—
	Abguß nach der Adsorption mit $Ca_3(PO_4)_2$		+++	+++	++	+	+	+	—		+++	++	++	+	+	+	—
	Die mit $^1/_{150}$ mol. $NaHPO_4$ extrahierte Lösung		+++	++	++	+	+	—	—		+++	++	++	+	+	—	—
	Die mit $^3/_{150}$ mol. Na_2HPO_4 extrahierte Lösung		+++	++	++	++	+	—	—		+++	++	++	+	+	—	—
	Die mit physiol. NaCl extrahierte Lösung		+++	+++	++	+	+	+	—		+++	++	++	+	+	+	—

Adsorptions- und Elutionsversuche des Antiagglutinins.

Endlich war noch die Frage zu beantworten, ob das Sojaantiagglutinin adsorbierbar und eluierbar ist. Bisher konnte ich über diesen Punkt nur einige vorläufige Versuche ausführen. Als Adsorptionsmittel benutzte ich frisch hergestelltes dreibasisches Calciumphosphat. Es wurde 20proz. Antiserum mit dem gleichen Volumen, dem anderthalbfachen und dem zweifachen Volumen Calciumphosphataufschwemmung zusammengebracht, indem in je ein Zentrifugenglas 4 ccm, 3 ccm und 2 ccm Calciumphosphat hineingegossen wurde. Durch Zentrifugieren entfernt man die Flüssigkeit, fügt dann je 2 ccm 20proz. Antiserum hinzu, mischt und zentrifugiert nach 30 Minuten. Die antiagglutinierende Wirkung der Abgüsse wurde untersucht. Es zeigte sich, daß sie in den beiden ersten Proben fast vollkommen, in der dritten Probe nur unvollkommen verschwand, das Antiagglutinin also wohl adsorbiert ist. Für die

eigentlichen Versuche wurde daher immer die anderthalbfache Menge Calciumphosphat verwandt. Nach Beendigung der Adsorption wurde der Rückstand immer zweimal mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen und dann mit dem eigentlichen Elutionsmittel eine Nacht zusammengelassen. Als Elutionsmittel kam sekundäres Natriumphosphat zur Anwendung (m/150 und m/50), die durch Verdünnung mit physiologischer Kochsalzlösung aus m/15 Lösung hergestellt wurden. Zur Neutralisation wurde m/15 primäres Kaliumphosphat benutzt. Die Resultate sind aus vorstehender Tabelle zu ersehen. (Vgl. Tabelle S. 130.)

Durch Behandlung mit Calciumphosphat wird also die antiagglutinierende Wirkung des Serums erheblich herabgedrückt. Während der Sojaextrakt bei Behandlung mit dem Serum erst bei einer Verdünnung von 0,125 bis 0,0625 % = 800- bis 1600facher Verdünnung agglutiniert, bemerkt man nach der Adsorption wieder, wie in Sojaextrakt allein bei einer Verdünnung von 0,0312 bis 0,0156 % = 3200- bis 6400facher Verdünnung Agglutination. Jedoch gelingt es nur sehr kümmerlich, mit sekundärem Natriumphosphat das Antiagglutinin zu eluieren.

Zusammenfassung.

1. Sojaagglutinin ist durch Adsorptionsmittel (Kaolin, Aluminiumhydroxyd, Calciumphosphat) adsorbierbar. Die Wirkung der Adsorptionsmittel ist von ihrer Menge abhängig.

2. Das adsorbierte Sojaagglutinin ist durch schwache Alkalien (Ammoniak, Na_2HPO_4) eluierbar. Durch schwache Säure (KH_2PO_4) wird es viel weniger gut eluiert.

3. Durch überschüssiges Adsorptionsmittel adsorbiertes Agglutinin wird schwerer eluiert als das Agglutinin, das nur durch mäßige Mengen des Adsorptionsmittels adsorbiert war.

4. Die agglutinierende Wirkung des Sojaagglutinins wird durch Siedehitze (einmaliges Aufkochen) aufgehoben.

5. Durch wiederholte Injektionen von Sojaextrakt erhält man bei Kaninchen ein Antiserum, das die Wirkung des Agglutinins hemmt. Dieses Antiserum hat eine gewisse Spezifität gegen Sojaagglutinin.

6. Normales Kaninchenserum wirkt gegen Ricin-, Jack-bean- und Phasin-Agglutinin verhältnismäßig stark hemmend, während es gegen Sojaagglutinin fast keine Wirkung hat.

7. Das Sojaantiagglutinin wird durch Adsorptionsmittel (Kaolin, Aluminiumhydroxyd, Calciumphosphat) fast vollkommen aus dem Serum entfernt. Die Elution aus den Rückständen ist bisher nur sehr unvollkommen gelungen.

Für die Versuche wurden Mittel verwandt, welche Herrn Professor Dr. *Martin Jacoby* von der Hojimi-Hoshi-Stiftung in dankenswerter Weise zur Verfügung gestellt waren.

Isolierungsversuche mit Crotin und Anticrotin.

Von

Kyoyetsuro Fujiwara aus Niigata (Japan).

(Aus dem biochemischen Laboratorium des Krankenhauses Moabit in Berlin.)

(Eingegangen am 5. Juni 1923.)

Die Isolierungsversuche der Toxine und Antitoxine sind von dem jeweiligen Stande der Enzymforschung insofern abhängig, als die Methodik genötigt ist, dieselben Wege zu verfolgen. Im Jahre 1901 hat *Jacoby*[1]) ein hochwirksames Ricinpräparat durch Kombination von Aussalzungs- und Verdauungsverfahren dargestellt, welches auch in konzentrierten Lösungen keine Eiweißreaktionen mehr gab. Schon damals stellte *Jacoby* fest, daß die reinen Präparate viel labiler als das noch von Schutzsubstanzen begleitete Toxin ist und erkannte diese Veränderung als ein Kriterium vorgeschrittener Isolierung. Später haben *Osborne* und *Mendel* aus Ricinussamen ein Albumin isoliert, das sehr giftig war. Es braucht heute nicht mehr erörtert zu werden, daß daraus nicht geschlossen werden darf, daß das Toxin mit dem Albumin identisch ist. Im Rahmen der im hiesigen Laboratorium begonnenen Versuche, mit Hilfe moderner Methodik die Toxinisolierung wieder zu studieren, habe ich einige Adsorptionsversuche mit Crotin gemacht. Der Einfachheit halber habe ich als Indikator der leider nur ziemlich schwachen Toxinwirkung des zur Verfügung stehenden Präparates die hämolytische Wirkung benutzt. Daß Crotin im Reagenzglase hämolytisch wirkt, ist schon lange bekannt, daß das Hämolysin als Antigen aufzufassen ist, wissen wir durch die Untersuchungen

[1]) Arch. f. exper. Pathol. u. Pharm. **46**, 1901.

Morgenroths, dem der Nachweis eines antihämolytisch wirksamen Anticrotins gelang.

Auf Veranlassung von Herrn Professor *Jacoby* habe ich geprüft, ob eine gewisse Isolierung des Crotins durch Adsorption und nachfolgende Elution möglich ist. Als Adsorptionsmittel benutzte ich Kaolin und Aluminiumhydroxyd, die bei den Arbeiten *Willstätters* so ausgezeichnete Dienste geleistet haben, ferner Calciumphosphat, das im hiesigen Laboratorium sich in zahlreichen Versuchen gut bewährt hatte.

Zur Prüfung der hämolytischen Wirksamkeit des Crotins wurden in Reagenzgläser je 1 ccm, 0,5, 0,2, 0,1 und 0 ccm der zu untersuchenden Lösungen gebracht und durch Auffüllen mit 0,85 proz. Kochsalzlösung auf 1 ccm überall dieselbe Verdünnung hergestellt. Nach dem Durchmischen wird zu jeder Probe je 1 ccm dreimal gewaschener 5 proz. Kaninchenblutkörperchen hinzugefügt, die jedesmal frisch bereitet wurden. Nach gutem Durchmischen kommen alle Proben für eime Stunde in den Brutschrank, dann in den Eisschrank. Nach dem Absetzen der ungelösten Blutkörperchen wird das Resultat abgelesen. Benutzt wurde 1 proz. Crotinlösung, gelöst in physiologischer Kochsalzlösung. Vor dem Gebrauch wurden die nicht ganz klaren Lösungen filtriert.

Adsorption mit Kaolin.

In vier Zentrifugierröhrchen bringt man je 5,0 ccm Crotinlösung und fügt Kaolin im Verhältnis von 2,0 bis 1,5 bis 1,0 und 0,5 g zu je 10 ccm der Lösung hinzu. Nach mehrmaligem Durchmischen wird nach 30 Minuten zentrifugiert. Die völlig klare Lösung wird abpipettiert und auf ihre hämolytische Kraft geprüft.

Kaolin zu 10,0 Lösung	I					II				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
2,0 g	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
1,5 g	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
1,0 g	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
0,5 g	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—
Kontr. 1 proz. Crotinlösung	+++	++	+	+	—	+++	++	+	+	—

Es bedeutet +++ komplette Hämolyse, ++ fast komplette Hämolyse, + mäßige Hämolyse, ± Spur Hämolyse, — keine Hämolyse.

Adsorption mit Aluminiumhydroxyd.

Als Adsorptionsmittel wurde Aluminiumhydroxyd (*Kahlbaum*, halogen- und schwefelfrei) benutzt. Es wurde ganz wie in den vorigen Versuchen vorgegangen.

Aluminiumhydroxyd	I					II				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
2 g	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
1,5 g	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
1,0 g	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
0,5 g	+	+	±	—	—	±	±	±	—	—
Kontr. 1 proz. Crotinlösung	+++	++	+	+	—	+++	+++	++	+	—

Adsorption mit Calciumphosphat.

Als Adsorptionsmittel wurde frisch bereitetes dreibasisches Calciumphosphat benutzt. 6,58 g Calciumchlorid und 7,6 g dreibasisches Natriumphosphat wurden in je 100 ccm Aqua destillata gelöst. Der entstehende Niederschlag wird bis zum Verschwinden der Chlorreaktion gewaschen und in 150 ccm physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmt. Alles sonst wie in den vorigen Versuchen.

$Ca_3(PO_4)_2$	I					II				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
3,0 ccm	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
2,0 ccm	±	—	—	—	—	±	—	—	—	—
1,0 ccm	+	+	±	—	—	+	±	±	—	—
Kontr. 1 proz. Crotinlösung	+++	++	+	+	—	+++	++	+	+	—

Man kann also sowohl durch Kaolin wie durch Aluminiumhydroxyd und durch Calciumphosphat das Crotin aus der Lösung entfernen. Man muß 1 g Kaolin oder Aluminiumhydroxyd oder 3 ccm $Ca_3(PO_4)_2$ auf 10 ccm Crotin anwenden, um vollkommene Wirkung zu erreichen.

Elutionsversuche.

Nach diesen Versuchen war anzunehmen, daß das Crotin von den betreffenden Adsorbentien adsorbiert worden war. Es sollte daher weiter geprüft werden, ob es sich eluieren läßt.

Als Elutionsmittel wurden angewandt: n/200 Ammoniak. m/150 primäres Kaliumphosphat und m/150 sekundäres Natriumphosphat. Die Ammoniaklösung wurde aus n/2 Ammoniak durch Verdünnen mit physiologischer Kochsalzlösung, die Lösung von Kaliumphosphat und Natriumphosphat aus m/15 Lösungen durch Verdünnen mit Kochsalzlösung hergestellt. 1 proz. Crotinlösung wurde mit bestimmten Mengen der Adsorptionsmittel behandelt. Nach der Adsorption wurden die Bodensätze zweimal mit der Kochsalzlösung gewaschen. Nach dem ersten Waschen wurde durch Kochsalzlösung das alte Volumen aufgefüllt und gut durchgemischt. Man bringt dann die Mischung in vier Zentrifugengläser und zentrifugiert nach dem Markieren der oberen Flüssigkeitsgrenze. Dann gießt man die Waschflüssigkeit ab und bringt in jedes Glas je ein Elutionsmittel bis zum Markierungszeichen und mischt durch. Man beläßt die Gläser eine Nacht im Eisschrank und zentrifugiert dann. Die Zentrifugate werden neutralisiert und dann auf ihre hämolytische Wirksamkeit geprüft. Zur Neutralisation wurde n/10 Salzsäure für Ammoniak, m/15 Na_2HPO_4 für KH_2PO_4, m/15 KH_2PO_4 für Na_2HPO_4 benutzt.

Elution des mit Kaolin adsorbierten Crotinhämolysins.

		I					II				
		1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
	1 proz. Crotinlösung	+++	++	+	+	—	+++	++	+	+	—
Adsorption	1. 10 ccm Lösung: 2 g Kaolin	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	2. 10 ccm Lösung: 1,0 g Kaolin	±	±	—	—	—	—	—	—	—	—
	3. 10 ccm Lösung: 0,5 g Kaolin	+	±	—	—	—	+	+	+	—	—
Elution	mit NH_3 1.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	2.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	3.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	mit Na_2HPO_4 1.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	2.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	3.	±	±	—	—	—	+	+	±	±	—
	mit KH_2PO_4 1.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	2.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	3.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	mit NaCl 1.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	2.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	3.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

Das durch Kaolin adsorbierte Crotin ist also durch schwache Alkalien kaum, durch schwache Säure gar nicht eluierbar.

Elution des mit Aluminiumhydroxyd adsorbierten Crotinhämolysins.

		I					II				
		1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
	1 proz. Crotinlösung	+++	+++	++	+	—	+++	+++	++	+	—
Adsorption	1. 10 ccm Lös.: 2,0 g $Al(OH)_3$	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	2. 10 ccm Lös.: 1,0 g $Al(OH)_3$	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	3. 10 ccm Lös.: 0,5 g $Al(OH)_3$	±	±	±	—	—	+	+	±	—	—
Elution	mit NH_3 1.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	2.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	3.	±	±	—	—	—	—	—	—	—	—
	mit Na_2HPO_4 1.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	2.	±	—	—	—	—	+	±	±	—	—
	3.	+	±	—	—	—	+	+	±	—	—
	mit KH_2PO_4 1.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	2.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	3.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	mit NaCl 1.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	2.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	3.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

Es gelang also nur eine geringfügige Elution mit Na_2HPO_4 zu erzielen, während sonst gar keine oder kaum eine Elution gelang.

Elution des mit Calciumphosphat adsorbierten Crotinhämolysins.

			I					II				
			1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
	1 proz. Crotinlösung		+++	++	+	+	—	+++	++	+	+	—
Adsorption	1. 10 ccm Lös.: 3 ccm $Ca_3(PO_4)_2$		—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	2. 10 ccm Lös.: 2 ccm $Ca_3(PO_4)_2$		±	—	—	—	—	±	±	—	—	—
	3. 10 ccm Lös.: 1 ccm $Ca_3(PO_4)_2$		+	+	±	—	—	+	±	±	—	—
Elution	mit NH_3	1.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
		2.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
		3.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	mit Na_2HPO_4	1.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
		2.	±	—	—	—	—	—	—	—	—	—
		3.	±	±	—	—	—	±	±	—	—	—
	mit KH_2PO_4	1.	±	—	—	—	—	±	—	—	—	—
		2.	±	—	—	—	—	±	—	—	—	—
		3.	±	—	—	—	—	±	—	—	—	—
	mit NaCl	1.	±	±	—	—	—	±	—	—	—	—
		2.	±	±	—	—	—	±	—	—	—	—
		3.	±	±	—	—	—	±	±	—	—	—

Beim Calciumphosphat ist also eine Elution bisher kaum gelungen. Eine Elution war also bisher bei Versuchen mit den drei angewandten Adsorptionsmitteln noch nicht möglich. Leider war bei der Knappheit des Materials eine Verbreiterung der Versuche noch nicht möglich.

Anticrotinserum.

Das immunisatorisch herstellbare Anticrotin ist bisher nur in seinen Reaktionen mit dem Hämolysin studiert worden. Als Vorversuche für eine später auszuführende Isolierung habe ich die Adsorption und Elution von Anticrotin untersucht.

Kaninchen Nr. 82, 2315 g, wurde Crotinextrakt siebenmal in steigender Dosis (5 ccm 1 proz. bis 20 ccm 20 proz. Lösung) in Zwischenpausen von 5 bis 9 Tagen subkutan injiziert. 8 Tage nach der letzten Injektion wurde das Blut entnommen und das Serum dargestellt (Antiserum Nr. 82).

Kaninchen Nr. 84, 1810 g, wurde Crotinextrakt fünfmal in steigender Dosis (10 ccm 0,5 proz. bis 20 ccm 1,5 proz. Lösung) in Zwischenpausen von 5 bis 8 Tagen subkutan injiziert. 10 Tage nach der letzten Injektion Blutentnahme und Serumdarstellung (Antiserum Nr. 84).

Bei der Prüfung auf antihämolytische Kraft diente als Indikator eine 5 proz. Aufschwemmung von dreimal gewaschenen Kaninchenblutkörperchen aus defibriniertem Blut. Als Lysin wurden 0,5 ccm einer immer frischen 1 proz. Crotinlösung, als Antilysin fünffach verdünntes Serum der immunisierten Kaninchen benutzt. Das Antiserum wurde entweder frisch benutzt oder ohne Zusatz im Eisschrank aufbewahrtes Serum verwandt.

Als Adsorptionsmittel kam die oben beschriebene Calciumphosphataufschwemmung, als Elutionsmittel m/150 u. m/50 sekundäres Natriumphosphat zur Anwendung. Verdünnung und Neutralisation nach der Adsorption wie oben.

Im einzelnen Versuche bringt man in fünf Reagenzgläser 1,0 — 0,5 — 0,2 — 0,1 und 0 ccm der auf Anticrotin zu prüfenden Lösung, füllt mit Kochsalzlösung auf 1 ccm auf, bringt in jedes Glas je 0,5 ccm 1 proz. Crotinlösung und mischt durch. Nach Zufügung von je 1 ccm Blutkörperchen kommen die Proben eine Stunde in den Brutschrank, dann in den Eisschrank. Nach dem Absitzen der ungelösten Blutkörperchen Ablesen des Resultates.

Zur Adsorption wurden 10 ccm Calciumphosphataufschwemmung in ein Zentrifugenglas gebracht und zentrifugiert. Nach dem Abgießen der Flüssigkeit bringt man 10 ccm fünffach verdünnter Serumlösung in das Glas und mischt gut durch. Nach 30 Minuten langem Kontakt wird zentrifugiert und der Abguß auf antihämolytische Kraft geprüft. Bei der Elution der Adsorbate wird der Bodensatz zunächst mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen, die Flüssigkeit dann mit Kochsalzlösung auf das alte Volumen aufgefüllt und durchgemischt. Dann

Versuch mit dem Serum Nr. 82.

Versuchsreihe		1	2	3	4	5	Bemerkungen
I	20 proz. Antiserum + 1,0 proz. Crotinlösung	—	—	+	+	—	Beim Mischen der Crotinlösung und des Antiserums zeigt sich die Präzipitinreaktion bis zum 2. Glas
	Das mit $Ca_3(PO_4)_2$ behandelte Antiserum + 1,0 proz. Crotinlösung	+++	+++	+++	+++	—	
	Eluierte Lösung mit m/150 Na_2HPO_4	++	++	++	++	—	
	Eluierte Lösung mit „ NaCl	+++	+++	+++	+++	—	
II	20 proz. Antiserum + 1,0 proz. Crotinlösung	—	—	±	+	—	Wie oben
	Das mit $Ca_3(PO_4)_2$ behandelte Antiserum + 1,0 proz. Crotinlösung	+++	+++	+++	+++	—	
	Eluierte Lösung mit m/150 Na_2HPO_4	++	++	++	++	—	
	Eluierte Lösung mit „ NaCl	+++	+++	+++	+++	—	
III	20 proz. Antiserum + 1,0 proz. Crotinlösung	—	—	+	++	—	Wie oben
	Das mit $Ca_3(PO_4)_2$ behandelte Antiserum + 1,0 proz. Crotinlösung	+++	+++	+++	+++	—	
	Eluierte Lösung mit m/150 Na_2HPO_4	++	++	++	++	—	
	Eluierte Lösung mit „ NaCl	+++	+++	+++	+++	—	

Versuch mit dem Serum Nr. 84.

Versuchsreihe		1	2	3	4	5	Bemerkungen
I	20 proz. Antiserum + 1,0 proz. Crotinlösung	—	—	+	++	—	Beim Mischen der Crotinlösung und des Antiserums zeigt sich die Präzipitinreaktion bis zum 2. Glas
	Das mit $Ca_3(PO_4)_2$ behandelte Antiserum + 1,0 proz. Crotinlösung	±	+	++	++	—	
	Eluierte Lösung mit m/150 Na_2HPO_4	+++	+++	+++	+++	—	
	Eluierte Lösung „ m/50 Na_2HPO_4	+++	+++	+++	+++	—	
	Eluierte Lösung „ NaCl	+++	+++	+++	+++	—	
II	20 proz. Antiserum + 1,0 proz. Crotinlösung	—	—	+	+	—	Wie oben
	Das mit $Ca_3(PO_4)_2$ behandelte Antiserum + 1,0 proz. Crotinlösung	±	+	++	++	—	
	Eluierte Lösung mit m/150 Na_2HPO_4	++	++	++	++	—	
	Eluierte Lösung „ m/50 Na_2HPO_4	++	++	++	++	—	
	Eluierte Lösung „ NaCl	++	++	++	++	—	
III	20 proz. Antiserum + 1,0 proz. Crotinlösung	—	—	+	++	—	Wie oben
	Das mit $Ca_3(PO_4)_2$ behandelte Antiserum + 1,0 proz. Crotinlösung	±	+	++	++	—	
	Eluierte Lösung mit m/150 Na_2HPO_4	+	+	++	++	—	
	Eluierte Lösung „ m/50 Na_2HPO_4	+	+	++	++	—	
	Eluierte Lösung „ NaCl	++	++	+++	+++	—	

wird die Aufschwemmung in drei Zentrifugengläser verteilt und nach Markierung der oberen Flüssigkeitsgrenze zentrifugiert. Nach Abguß der Flüssigkeit werden nun die Extraktionsmittel in die Gläser gebracht, und zwar in je eins m/150, m/50 sekundäres Natriumphosphat und in eins Kochsalzlösung. Durchmischen. über Nacht Verbleiben im Eisschrank, Zentrifugieren. Nach Neutralisation Prüfung auf antihämolytische Kraft.

Das Antiserum wirkt gegen das Crotinhämolysin antihämolytisch, und zwar neutralisieren 0,5 ccm 20 proz. Antiserum 0,5 1 proz. Crotinlösung, also 0,1 ccm Serum 5 mg Crotin. Durch Behandlung mit Calciumphosphat wird das Serum vollkommen wirkungslos, die Elution bringt auch nur ganz geringe Mengen des Antikörpers in Lösung.

Die Ergebnisse dieses Versuches stimmen mit denen des vorigen überein.

Endlich habe ich noch geprüft, inwieweit die Antihämolysinwirkung spezifisch ist. Es wurden daher zwei normale Kaninchensera untersucht.

Normales Kaninchenserum hat keine antihämolytische Wirkung gegen Crotin. Diese Versuche beweisen ferner, daß die Behandlung des Serums mit Calciumphosphat und Natriumphosphat an sich ohne Wirkung auf die Crotinhämolyse ist.

Serum		1	2	3	4	5	Bemerkungen
A	20 proz. Serum + 1,0 proz. Crotinlösung	+++	+++	+++	+++	—	Keine Präzipitinreaktion beim Mischen des Serums und der Crotinlösung
	Das mit $Ca_3(PO_4)_2$ behandelte normale Serum + 1,0 proz. Crotinlösung	+++	+++	+++	+++	—	
	Eluierte Lösung mit m/150 Na_2HPO_4	+++	+++	+++	+++	—	
	Eluierte Lösung „ m/150 Na_2HPO_4	+++	+++	+++	+++	—	
B	20 proz. Serum + 1,0 proz. Crotinlösung	+++	+++	+++	+++	—	Dasselbe wie bei Serum A
	Das mit $Ca_3(PO_4)_2$ behandelte normale Serum + 1,0 proz. Crotinlösung	+++	+++	+++	+++	—	
	Eluierte Lösung mit m/150 Na_2HPO_4	+++	+++	+++	+++	—	
	Eluierte Lösung „ m/150 Na_2HPO_4	+++	+++	+++	+++	—	

Zusammenfassung.

1. Das Crotinhämolysin verliert seine hämolytische Wirkung durch Behandlung mit geeigneten Mengen des Adsorptionsmittels (Kaolin, Aluminiumhydroxyd, frisch bereitetes Calciumphosphat).

2. Eine sichere Elution des Hämolysins gelingt bisher noch nicht. Es scheint allerdings eine begrenzte Elution möglich zu sein.

3. Immunisatorisch kann man ein Antihämolysin herstellen, das bei Behandlung mit Calciumphosphat seine Wirkung verliert. Durch Elution ist das Anticrotin kaum in Lösung zu bringen. Normales Kaninchenserum wirkt gegen Crotin nicht antihämolytisch.

Über die Einwirkung des metallischen Kupfers auf Ricin.

Von

Mitsutaro Tsuchihashi.

(Aus dem biochemischen Laboratorium des Krankenhauses Moabit in Berlin.)

(Eingegangen am 5. Juni 1923.)

Vor einigen Jahren hat *Jacoby*[1]) in seinen „Studien zur allgemeinen Vergiftungslehre" nachgewiesen, daß die Strukturvergiftung der roten Blutzellen durch Quecksilbersublimat oder durch Kupfersulfat durch Überführung der Salze in komplexe Verbindungen mit Hilfe von Cyankalium oder Glykokoll verhütet wird.

Ich habe auf Anregung von Herrn Professor *Jacoby* den Einfluß des metallischen Kupfers auf Ricin und weiter den Einfluß von Cyankalium und Glykokoll auf das schon gekupferte Ricin untersucht.

Wie bekannt, besitzt Ricin hämagglutinierende und toxische Eigenschaften. Trotz mehrerer Versuche ist es noch nicht endgültig entschieden, ob die hämagglutinierenden und toxischen Eigenschaften von *einer* Substanz hervorgerufen werden. Daher habe ich getrennt den Einfluß des Kupfers auf die hämagglutinierenden und toxischen Eigenschaften untersucht.

1. Die Einwirkung des Kupfers auf die agglutinierende Eigenschaft des Ricins.

Ich habe zuerst die Einwirkung des gekupferten Ricins auf die roten Blutkörperchen untersucht.

Versuch 1.

Die Wirkung des gekupferten Ricins auf die roten Blutkörperchen:

1 g Kupfer (Kupferpulver reduziert extrafein *Kahlbaum*) wurde mit 20 ccm einer 0,1 proz. unfiltrierten trüben Ricinlösung gemischt und 1 Tag im Eisschrank stehengelassen. Zur Verwendung kam *Merck*sches Ricin, das schon Jahrzehnte alt ist, aber noch gut wirksam ist. Die Mischung wurde stark zentrifugiert und abfiltriert. Die gewonnene klare Lösung wurde zum Versuch benutzt.

Als Kontrolle wurde 0,1 proz. unfiltrierte Ricinlösung auf analoge Weise zentrifugiert und filtriert und die erhaltene klare Lösung benutzt.

Die Aufschwemmung der roten Blutkörperchen wurde aus Kaninchenblut hergestellt, welche nach dem Defibrinieren mit physiologischer Kochsalzlösung mehrfach gewaschen und als eine 5 proz. Aufschwemmung gebraucht wurde.

---

[1]) *Jacoby*, diese Zeitschr. **76**, 1916.

Bei diesen Versuchen wurde die nötige Verdünnung stets mit physiologischer Kochsalzlösung hergestellt. Der Versuch wurde in folgender Weise ausgeführt:

Eine Reihe von Reagenzgläsern wurde mit absteigenden Mengen der gekupferten Ricinlösung beschickt (und zwar so, daß in das erste Gläschen 1 ccm und in das letzte 0,01 ccm kamen). Sämtliche Reagenzgläser wurden mit physiologischer Kochsalzlösung bis auf 1 ccm aufgefüllt, 1 ccm einer 5 proz. Blutkörperchenaufschwemmung zugefügt und 24 Stunden bei Zimmertemperatur stehengelassen.

Menge der Cu-Ricinlösung ccm		Menge der Ricinlösung ohne Cu (Kontrolle) ccm	
1,0, 0,9, 0,8, 0,7, 0,6, 0,5, 0,4, 0,3	komplette Hämolyse	1,0, 0,9, 0,8, 0,7, 0,6, 0,5, 0,4, 0,3	komplette Agglutination
0,2	fast komplette Hämolyse	0,2, 0,1	fast komplette Agglutination
0,1, 0,09, 0,08	inkomplette Hämolyse	0,09, 0,08	inkomplette Agglutination
0,07, 0,06	Spuren Hämolyse	0,07, 0,06, 0,05	Spuren Agglutination
0,05, 0,04, 0,03, 0,02, 0,01, 0	keine Hämolyse	0,04, 0,03, 0,02, 0,01, 0	keine Agglutination

Wie aus der angeführten Tabelle ersichtlich ist, agglutiniert das Ricin ausgezeichnet. Aber das gekupferte Ricin zeigt keine Hämagglutination, dagegen eine deutliche Hämolyse.

Es ist schon bekannt, daß gekochtes Ricin keine Hämagglutination aufweist, ich habe nun versucht, die Wirkung desselben auf die roten Blutkörperchen nach Kupferzusatz zu prüfen.

Versuch 2.

Die Wirkung des gekochten Ricins bei Gegenwart von Kupfer auf die roten Blutkörperchen:

Eine 0,1 proz. Ricinlösung wurde zum Sieden gebracht. 20 ccm davon wurden mit 1 g Kupfer versetzt und 1 Tag im Eisschrank stehengelassen. Dann wurde dieselbe zentrifugiert und abfiltriert.

Als Kontrolle wurde dieselbe gekochte Ricinlösung (ohne Kupfer) ebenfalls zentrifugiert und abfiltriert. Die erhaltenen klaren Lösungen

wurden benutzt. Die Versuchsordnung gestaltete sich in gleicher Weise wie in vorigem Versuch.

Menge der gekupferten gekochten Ricinlösung ccm		Menge der gekochten Ricinlösung ohne Cu ccm	
1,0; 0,9; 0,8; 0,7; 0,6; 0,5; 0,4; 0,3; 0,2	komplette Hämolyse	1,0; 0,9; 0,8; 0,7; 0,6; 0,5; 0,4; 0,3; 0,2; 0,1; 0,09; 0,08; 0,07; 0,06; 0,05; 0,04; 0,03; 0,02; 0,01; 0	keine Spur Agglutination
0,1	inkomplette Hämolyse		
0,09; 0,08; 0,07; 0,06; 0,05	Spur Hämolyse		
0,04; 0,03; 0,02; 0,01; 0	keine Hämolyse		

Wie aus diesem Versuch hervorgeht, macht auch hier das gekochte Ricin keine Agglutination. Auch das gekochte Ricin nach Kupferzusatz gibt keine Agglutination, sondern nur eine ungefähr gleiche Hämolyse wie beim ungekochten Ricin.

Hess und *Reitler*[1]), *Luger*[2]), haben einen hämolytischen Effekt der gekupferten Kochsalzlösung nachgewiesen. Ich habe, wie aus den nachstehenden Versuchen ersichtlich ist, dasselbe festgestellt.

Versuch 3.

Die Wirkung der gekupferten Kochsalzlösung auf die roten Blutkörperchen:

1 g Kupfer wurde mit 20 ccm 0,85 proz. Kochsalzlösung gemischt und einen Tag im Eisschrank stehengelassen, dann zentrifugiert und abfiltriert, und das erhaltene Filtrat wurde benutzt. Die Versuchsanordnung gestaltete sich in gleicher Weise wie in den vorigen Versuchen.

Menge der gekupferten Kochsalzlösung ccm		Menge der gekupferten Kochsalzlösung ccm	
1,0; 0,9	inkomplette Hämolyse	0,4; 0,3; 0,2	Spur Hämolyse
0,8; 0,7; 0,6; 0,5	Spur Hämolyse	0,1; 0	keine Hämolyse

[1]) Diese Zeitschr. **123**, 51, 1921.
[2]) Med. Klin. 1920, S. 1239.

Die gekupferte physiologische Kochsalzlösung macht also auch eine Hämolyse, die aber weniger deutlich ausfällt, als die bei der gekupferten oder gekupferten gekochten Ricinlösung. Es ist hier bemerkenswert, daß die Kochsalzlösung nach 24stündigem Kontakt mit Kupfer nur eine kaum bemerkbare grünliche Verfärbung aufweist. Bei der gekupferten oder gekupferten gekochten Ricinlösung war dieselbe ziemlich deutlich sichtbar.

Aus den angeführten drei Versuchen, die mehrfach angestellt wurden, kann man folgendes feststellen: Die Ricinlösung macht Hämagglutination, aber die gekochte nicht. Bei Kupferzusatz zeigt ungekochte und gekochte Ricinlösung eine deutliche hämolytische Eigenschaft von fast gleicher Stärke; dabei verschwindet bei der ersteren gleichzeitig die Hämagglutination. Diese Hämolyse fällt hier stärker aus, als bei der gekupferten physiologischen Kochsalzlösung allein. Aber die Hämolyse der gekupferten Ricinlösung ist höchstwahrscheinlich nicht als eine spezifische Wirkung des gekupferten Ricins, sondern als eine Einwirkung des in Lösung übergegangenen Kupfers selbst anzusehen.

Weitere Versuche habe ich angestellt, um den Einfluß des Glykokolls und Cyankaliums auf die Wirkung der gekupferten Ricinlösung zu beobachten.

Versuch 4.

Der Einfluß des Glykokolls und des Cyankaliums auf die Wirkung der gekupferten Ricinlösung:

Bei diesem Versuche wurde zunächst geprüft, ob die gebrauchte Menge von Glykokoll oder Cyankalium die eigentliche agglutinierende Eigenschaft des Ricins schädigt und ob sie die roten Blutkörperchen irgendwie verändert.

Absteigenden Mengen 0,1 proz. Ricinlösung, mit physiologischer Kochsalzlösung auf 1 ccm aufgefüllt, + 1 ccm 0,1 proz. Glykokollösung oder 0,01 proz. Cyankaliumlösung oder physiologischer Kochsalzlösung (Kontrolle) + 1 ccm 5 proz. Blutkörperchen.

Menge der Ricinlösung ccm	NaCl (Kontrolle)	Glykokoll	Cyankalium
1,0 0,8 0,6 0,4	komplette Agglutination	komplette Agglutination	komplette Agglutination
0,2	fast kompl. Agglutination	fast komplette Agglutination	fast komplette Agglutination
0,1 0,08	inkompl. Agglutination	inkomplette Agglutination	inkomplette Agglutination
0,06	. . Spur Agglutination	Spur Agglutination	Spur Agglutination
0,04 0,02 0,01 0	. . keine Agglutination	keine Agglutination	keine Agglutination

Wie aus dieser Tabelle hervorgeht, gibt es keinen Unterschied zwischen den Kontroll- und den mit Glykokoll oder Cyankalium versetzten Reihen. In allen Gläsern wurde keine Spur Hämolyse gefunden. Daraus geht hervor, daß diese Menge des Glykokolls oder Cyankaliums keine Veränderungen verursacht. Daher wurden für die nächsten Versuche gleiche Mengen benutzt.

Sämtliche Reagenzgläser, die absteigende Mengen der gekupferten Ricinlösung enthielten, wurden mit physiologischer Kochsalzlösung bis auf 1 ccm versetzt. Dabei wurde in einer Reihe je 1 ccm 0,1 proz. Glykokolllösung und in einer anderen je 1 ccm 0,01 proz. Cyankaliumlösung zugesetzt und erst nach etwa 10 Minuten 1 ccm 5 proz. Blutkörperchen hinzugefügt. Die Kontrollreihe erhielt statt Glykokoll- oder Cyankaliumlösung 1 ccm physiologische Kochsalzlösung.

Menge d. gekupferten Ricinlösung ccm	NaCl (Kontrolle)	Glykokoll	Cyankalium
1,0	komplette Hämolyse	keine Hämolyse und Agglutination	keine Hämolyse und Agglutination
0,8			
0,6			
0,4			
0,2	fast kompl. Hämolyse		
0,1	inkomplette Hämolyse		
0,08			
0,06	Spur Hämolyse		
0,04	keine Hämolyse		
0,02			
0,01			
0			

Wie aus dieser Tabelle ersichtlich ist, wird die Hämolyse durch gekupferte Ricinlösung durch Zusatz von Glykokoll oder Cyankalium vollständig verhütet, dabei wird die agglutinierende Eigenschaft, welche durch Kupfer beseitigt wird, nicht wieder reaktiviert.

Wie ich schon oben mitgeteilt habe, ist höchstwahrscheinlich die Hämolyse der gekupferten Ricinlösung durch das in Lösung übergegangene Kupfer entstanden.

In den folgenden Versuchen habe ich geprüft, ob das Antiserum irgend eine spezifische Wirkung auf die gekupferte Ricinlösung ausüben kann.

Versuch 5.

Der Einfluß des Antiricinserums auf die Wirkung der gekupferten Ricinlösung:

Um ein Antiricinserum zu gewinnen, wurde einem Kaninchen von 3,1 kg Körpergewicht in der ersten Woche 0,1 mg und in den folgenden Wochen allmählich stärkere Dosen Ricin und in der neunten Woche 10 mg subkutan injiziert. 8 Tage nach der letzten Injektion wurde ein Serum, welches die folgende Wirksamkeit enthielt, gewonnen.

Das Antiserum und das normale Serum (letzteres wurde zwecks Kontrolle aus einem normalen Kaninchen gewonnen) wurde mit physiologischer Kochsalzlösung zehnfach verdünnt (10 %). Absteigende Mengen des 10 proz.

Antiserums oder des 10 proz. normalen Serums, mit physiologischer Kochsalzlösung bis auf 1 ccm aufgefüllt, + 0,5 ccm 0,1 proz. Ricinlösung + 1 ccm 5 proz. Blutkörperchen.

Antiserum (Serummenge) ccm		Normalserum (Serummenge) ccm	
1,0		1,0	
0,9		0,9	
0,8	. . keine Spur Agglutination (1,0–0,7)	0,8	
0,7		0,7	
0,6		0,6	
0,5	. . . . . . Spur Agglutination (0,6–0,4)	0,5	
0,4		0,4	
0,3	. . inkomplette Agglutination	0,3	fast komplette Agglutination (1,0–0,06)
0,2		0,2	
0,1		0,1	
0,09		0,09	
0,08		0,08	
0,07	. fast komplette Agglutination (0,2–0,04)	0,07	
0,06		0,06	
0,05		0,05	
0,04		0,04	
0,03		0,03	
0,02		0,02	. . . komplette Agglutination (0,05–0)
0,01	. . . komplette Agglutination (0,03–0)	0,01	
0		0	

Dieses wirksame Antiserum wurde zum Versuche gebraucht. Die gekupferte Ricinlösung wurde in gleicher Weise wie immer hergestellt.

Absteigende Mengen 10 proz. Antiserums (oder 10 proz. Normalserums) mit physiologischer Kochsalzlösung bis auf 1 ccm aufgefüllt, + 0,5 ccm gekupferte Ricinlösung + 1 ccm 5 proz. Blutkörperchen.

Antiserum (Serummenge) ccm		Normalserum (Serummenge) ccm	
1,0		1,0	
0,9		0,9	
0,8		0,8	
0,7		0,7	
0,6		0,6	
0,5		0,5	
0,4		0,4	
0,3		0,3	. . . . keine Hämolyse (1,0–0,04)
0,2	. . . . keine Hämolyse (1,0–0,03)	0,2	
0,1		0,1	
0,09		0,09	
0,08		0,08	
0,07		0,07	
0,06		0,06	
0,05		0,05	
0,04		0,04	
0,03		0,03	
0,02	. . . . Spur Hämolyse	0,02	. . . . Spur Hämolyse (0,03–0,02)
0,01	. . . . inkomplette Hämolyse	0,01	. . . . inkomplette Hämolyse
0	. . . . . komplette Hämolyse	0	. . . . . komplette Hämolyse

Das Antiricinserum und das normale Serum hemmen in fast gleicher Weise die Hämolyse der gekupferten Ricinlösung. Kein Unterschied zwischen der Wirkung der beiden Sera wird gefunden; mit anderen Worten: das Antiricinserum übt keine spezifische Wirkung auf die Hämolyse der gekupferten Ricinlösung aus.

Ferner habe ich versucht, die Wirkung des metallischen Kupfers auf Antiserum bzw. auf Antihämolysinwirkung zu prüfen; aber dieser Versuch genügte nicht, um ganz sichere Schlüsse daraus zu ziehen. Über diese Frage kann ich nur folgenden Versuch mitteilen:

Versuch 6.

Die Wirkung des Kupfers auf das Antiricinserum: 20 ccm 10 proz. Antiserums wurden mit 0,5 g Kupfer versetzt und einen Tag im Eisschrank stehengelassen, dann zentrifugiert und filtriert.

Absteigende Mengen dieses Filtrats mit physiologischer Kochsalzlösung bis auf 1 ccm aufgefüllt, + 0,5 ccm 0,1 proz. Ricinlösung + 1,0 ccm 5 proz. Blutkörperchen. (Als Kontrolle wurde statt 0,1 proz. Ricinlösung 0,5 ccm physiologische Kochsalzlösung zugesetzt.)

Mit Ricinlösung.

Serummenge	Hämolyse	Agglutination
1,0	komplett	
0,8	"	
0,6	"	schwer erkennbar
0,4	"	
0,2	fast komplett	
0,1	Spur	
0,08	"	fast komplett
0,06		
0,04		
0,02	keine Spur	komplett
0,01		
0		

Ohne Ricinlösung.

Serummenge		Serummenge	
1,0		0,08	Spur komplette Hämolyse
0,8		0,06	
0,6	komplette Hämolyse	0,04	
0,4		0,02	keine Spur Hämolyse
0,2		0,01	
0,1	fast komplette Hämolyse	0	

Ob das Antiserum noch antiagglutinierende Wirkung hat, ist kaum festzustellen, da die hämolytische Wirkung des Kupfers den Versuch stört.

Ich habe daher durch Zusatz von Glykokoll die Hämolyse beseitigt. 20 ccm 10proz. Antiserum wurde mit 0,5 g Kupfer versetzt

und einen Tag im Eisschrank stehengelassen, dann zentrifugiert und filtriert. Als Kontrolle wurden 10 % kupferfreies Antiserum abfiltriert. Die erhaltenen Filtrate wurden benutzt.

Absteigende Mengen des gekupferten Antiserums (oder des kupferfreien Antiserums) mit physiologischer Kochsalzlösung bis auf 1 ccm aufgefüllt, + 0,5 ccm 0,1 proz. Glykokoll + 0,5 ccm 0,1 proz. Ricin + 0,5 ccm 10 proz. Blutkörperchen.

Serummenge ccm	Gekupfertes Antiserum mit Glykokoll	Antiserum (ohne Kupfer) mit Glykokoll
1,0	keine Agglutination	keine Agglutination
0,9		
0,8		
0,7		
0,6	Spur Agglutination	Spur Agglutination
0,5	inkomplette Agglutination	inkomplette Agglutination
0,4		
0,3		
0,2	fast komplette Agglutination	fast komplette Agglutination
0,1		
0,08		
0,06		
0,04	komplette Agglutination	komplette Agglutination
0,02		
0,01		
0		

Die Hämolyse war bei gekupfertem Serum bei Gegenwart von Glykokoll nirgends zu sehen und, wie aus der Tabelle ersichtlich ist, ist die Wirksamkeit des Antiricinserums durch Kupfer nicht dauernd beseitigt. Wenn auch nur ein Versuch in dieser Richtung vorliegt, so scheint es doch, daß das Kupfer keine und jedenfalls keine irreversible Einwirkung auf das Antiagglutinin ausübt.

2. Die Einwirkung des Kupfers auf die toxische Eigenschaft des Ricins.

In den vorher angeführten Versuchen ist gezeigt worden, daß die hämagglutinierende Eigenschaft des Ricins durch Kupfer verloren geht. Hier habe ich weiter untersucht, ob Kupfer ebenfalls auf die toxische Eigenschaft des Ricins schädigend einwirkt.

Für die Versuche wurden Mäuse verwendet. Die einfache oder gekupferte Ricinlösung wurde wie bei den früheren Versuchen hergestellt: 1 g Kupfer wurde in 20 ccm 0,1 proz. Ricinlösung gebracht und einen Tag im Eisschrank stehengelassen. Dann wurde diese Mischung zentrifugiert und filtriert. Die einfache Ricinlösung wurde aus einer 0,1 % getrübten Lösung ebenfalls durch Zentrifugieren und Filtrieren hergestellt.

Die gewonnene klare Lösung wurde Mäusen subkutan injiziert. Nach dem Tode wurden dieselben seziert. Bei jedem Fall wurde mehr

oder weniger die für Ricin charakteristische Darmveränderung festgestellt.

Maus Nr.	Körpergewicht g	Injektionsdosis mg	Lebensdauer
	Einfache Ricinlösung.		
1	17	0,01	lebt
2	17	0,02	„
3	17	0,03	„
4	20	0,05	7 Tage
5	15	0,05	6 „
6	17	0,1	6 „
7	15	0,1	5 „
	Gekupferte Ricinlösung.		
8	17	0,1	lebt
9	19	0,2	„
10	15	0,5	8 Tage
11	15	0,5	8 „
12	20	1,0	8 „
13	20	1,0	5 „
14	24	1,5	7 „

Wie aus dieser Tabelle ersichtlich ist, können Mäuse gekupfertes Ricin viel mehr vertragen als einfaches Ricin, d. h. Kupfer wirkt ebenfalls auf die toxische Eigenschaft des Ricins abschwächend ein.

Ich habe ebenfalls die Einwirkung von Glykokoll auf die gekupferte Ricinlösung untersucht, aber schwankende Resultate erhalten.

Zusammenfassung.

1. Metallisches Kupfer wirkt schädigend auf die hämoagglutinierende Eigenschaft des Ricins und zeigt dabei eine Hämolyse; die letztere scheint keine spezifische Erscheinung des gekupferten Ricins, sondern durch die Einwirkung des Kupfers selbst verursacht.

2. Durch Glykokoll- und Cyankaliumzusatz zu der gekupferten Ricinlösung wird die Hämolyse aufgehoben, aber die Hämagglutination wird dadurch nicht reaktiviert.

3. Antiricinserum übt keinen spezifischen Einfluß auf die gekupferte Ricinlösung aus.

4. Metallisches Kupfer scheint keine irreversible Einwirkung auf das Antiagglutinin auszuüben.

5. Metallisches Kupfer wirkt auch auf die toxische Eigenschaft des Ricins schädigend ein.

Über die Einwirkung der Metalle auf Pepsin.

Von

Mitsutaro Tsuchihashi.

(Aus dem biochemischen Laboratorium des Krankenhauses Moabit in Berlin.)

(Eingegangen am 5. Juni 1923.)

Jacoby und *Shimizu*[1]) haben gefunden, daß die Sojaurease nicht durch Eisen, wohl aber durch Kobalt, Nickel, Kupfer und Zink inaktiviert wird. Bei dem weiteren Ausbau dieser Untersuchungen ist es von besonderem Interesse, möglichst spezifische Unterschiede aufzufinden. Zweierlei ist von Bedeutung:

1. Verhalten sich im System sehr nahestehende Metalle verschieden gegenüber einem bestimmten Enzym?

2. Reagieren die verschiedenen Enzyme anders gegenüber denselben Metallen?

Zeigen sich entsprechende Unterschiede, so wird immer noch später zu entscheiden sein, ob die Reaktion direkt mit den Enzymen stattfindet oder ob primäre Begleitstoffe des Enzyms reagieren, wodurch das Enzym in seiner Wirkung erst sekundär beeinflußt wird. Je weiter die Reinigung der Enzyme voranschreitet, desto mehr wird auch dieses Problem seiner Lösung sich nähern. Restlos wird es erst geklärt werden können, wenn die Enzyme rein vorliegen werden.

Auf Anregung von Herrn Professor *Jacoby* habe ich in dieser Arbeit den Einfluß der Metalle auf Pepsin untersucht und geprüft, ob eine Reaktivierung hier ebenfalls stattfindet.

Als Metalle wurden Eisen, Kobalt, Nickel, Kupfer und Zink angewandt. Die Ausführung der Versuche gestaltete sich in folgender Weise:

Zu je 10 ccm einer 0,2proz. wässerigen, unfiltrierten, getrübten Pepsinlösung, die aus Pepsinum purissimum solubile *Witte* angefertigt wurde, das in hochwirksamer Form von der Firma seinerzeit besonders

---

[1]) *M. Jacoby* und *T. Shimizu*, diese Zeitschr. **128**, 1922.

für wissenschaftliche Zwecke dargestellt war, wurde je 1 g Zink, Kupfer, Eisen, Kobalt oder Nickel zugefügt, gut gemischt und während einer bestimmten Zeit im Eisschrank stehen gelassen. Als Metalle wurden folgende Präparate benutzt:

Eisen gepulvert, D. A. B. 5 (*Kahlbaum*), Kobalt, reduziert, Pulver (*Kahlbaum*), Nickel-Pulver (*Kahlbaum*), Kupfer-Pulver reduziert extrafein (*Kahlbaum*), Zink-Zinkpulver (Zinkstaub) extrafein (*Kahlbaum*).

Dann wurden diese mit den Metallen im Kontakt gestandenen Lösungen stark zentrifugiert und filtriert; die dabei gewonnenen klaren Filtrate wurden zu den Versuchen benutzt. Als Kontrolle wurde dieselbe Pepsinlösung auf analoge Weise zentrifugiert und filtriert und das gewonnene klare Filtrat benutzt. Die Reagenzgläser wurden mit absteigenden Mengen dieser Filtrate in der Weise beschickt, daß in das erste 1 ccm, in das zweite 0,5 ccm, in das dritte 0,2 ccm, in das vierte 0,1 ccm und in das letzte 0 getan wurde und alle mit destilliertem Wasser bis auf 1 ccm aufgefüllt wurden. Hierauf wurden zu jedem Gläschen 0,5 ccm n/10 Salzsäure und 2 ccm 5 proz., vorher im Brutofen bei 37° C verflüssigte Gelatinelösung — hergestellt aus reiner französischer Gelatine — hinzugesetzt. Dann wurden sie im Brutofen bei 37° C belassen.

Nach 24 Stunden wurden sie alle auf einmal in Eiswasser gebracht und gründlich abgekühlt. Das Resultat wurde sofort und außerdem nach einstündigem Stehen bei Zimmertemperatur nach dem Herausziehen aus dem Eiswasser bestimmt. Dabei wurde der Verflüssigungszustand der Gelatine in fünf Grade geteilt, und zwar in folgender Weise bezeichnet: vollständig flüssig (+++), halb flüssig (++), weich (+), ein wenig weich (±) und fest (—).

Zuerst habe ich die Pepsinlösung untersucht, die 24 Stunden mit den Metallen im Kontakt gewesen war.

Tabelle I.

Nach 24stündigem Kontakt mit Eisen, Kobalt, Nickel, Kupfer und Zink.

Pepsinlösung ccm	Pepsin	+ Eisen	+ Kobalt	+ Nickel	+ Kupfer	+ Zink
	Sofort nach dem Herausziehen aus dem Eiswasser					
1,0	+++	++	++	+++	—	—
0,5	+++	±	±	+++	—	—
0,2	±	±	±	±	—	—
0,1	—	—	—	—	—	—
0	—	—	—	—	—	—
	Nach einstündigem Stehen bei 17,5° C					
1,0	+++	+++	+++	+++	±	±
0,5	+++	+++	+++	+++	—	—
0,2	+++	+++	+++	+++	—	—
0,1	+++	+++	+++	+++	—	—
0	—	—	—	—	—	—

Somit wird Pepsin durch Kupfer und Zink stark, durch Eisen und Kobalt schwach geschädigt, aber durch Nickel findet keine Schädigung statt.

Zur Prüfung des zeitlichen Verlaufs der Schädigung wurde die Pepsinlösung mit Zink und Kupfer eine kürzere Zeit und mit den anderen Metallen eine längere Zeit als bei dem vorherigen Versuch gelassen.

Tabelle II.

Nach einem ½stündigen Kontakt mit Zink und Kupfer.

Pepsinlösung ccm	Pepsin	+ Kupfer	+ Zink
	Sofort nach dem Herausziehen aus dem Eiswasser		
1,0	+++	++	++
0,5	+++	±	±
0,2	±	—	—
0,1	—	—	—
0	—	—	—
	Nach einstündigem Stehen bei 1700		
1,0	+++	+++	+++
0,5	+++	+++	+++
0,2	+++	+++	+++
0,1	+++	++	++
0	—	—	—

Im Vergleich mit der 24stündig im Kontakt gestandenen Lösung ist die Schädigung hier geringer, aber doch deutlich bemerkbar.

Tabelle III.

Nach dreitägigem Kontakt mit Eisen, Kobalt und Nickel.

Pepsinlösung ccm	Pepsin	+ Eisen	+ Kobalt	+ Nickel
	Sofort nach dem Herausziehen aus dem Eiswasser			
1,0	+++	+	+	+++
0,5	+++	—	—	+++
0,2	±	—	—	±
0,1	—	—	—	—
0	—	—	—	—
	Nach einstündigem Stehen bei 17° C			
1,0	+++	+++	+++	+++
0,5	+++	+++	+++	+++
0,2	+++	+++	+++	+++
0,1	+++	++	++	+++
0	—	—	—	—

Erst nach dreitägigem Kontakt wirken Eisen und Kobalt stark schädigend ein, aber Nickel weist auch dabei keine Schädigung auf.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß Pepsin sehr empfindlich für Zink und Kupfer und auch etwas für Eisen und Kobalt und völlig unempfindlich für Nickel ist.

Es wurde dann geprüft, ob das inaktivierte Pepsin durch Glykokoll reaktiviert werden kann. Für diese Versuche wurde die mit Zink und

Kupfer im Kontakt gestandene und dadurch stark geschädigte Pepsinlösung gebraucht.

Absteigende Mengen der 24 Stunden mit Zink und Kupfer im Kontakt gestandenen Pepsinlösung, aufgefüllt auf je 1 ccm Wasser + 0,5 ccm 1 proz. Glykokollösung + 0,5 ccm n/10 Salzsäure + 2 ccm 5 % Gelatine.

Tabelle IV.

Mit Glykokoll versetzte Reihe.

Pepsinlösung ccm	Pepsin	+ Kupfer	+ Zink
Sofort nach dem Herausziehen aus dem Eiswasser			
1,0	+++	—	—
0,5	+++	—	—
0,2	±	—	—
0,1	—	—	—
0	—	—	—
Nach einstündigem Stehen bei 17° C			
1,0	+++	±	±
0,5	+++	—	—
0,2	+++	—	—
0,1	+++	—	—
0	—	—	—

Kontrollreihe.

Statt Glykokollösung wurde 0,5 ccm destilliertes Wasser zugesetzt.

Pepsinlösung ccm	Pepsin	+ Kupfer	+ Zink
Sofort nach dem Herausziehen aus dem Eiswasser			
1,0	+++	—	—
0,5	+++	—	—
0,2	+	—	—
0,1	—	—	—
0	—	—	—
Nach einstündigem Stehen bei 17° C			
1,0	+++	±	±
0,5	+++	—	—
0,2	+++	—	—
0,1	+++	—	—
0	—	—	—

Wie aus der Tabelle ersichtlich ist, gibt es keinen Unterschied zwischen der mit Glykokoll versetzten und der glykokollfreien Reihe. Anstatt mit 0,5 ccm einer 1 proz. Lösung wurde dieser Versuch mit 0,5 ccm 5 proz. Glykokollösung wiederholt. Aber auch hier wurde kein Unterschied zwischen den beiden Versuchsreihen gefunden.

Ferner wurde derselbe Versuch mit einer mit diesen Metallen während 30 Minuten im Kontakt gestandenen Pepsinlösung und 5 proz. Glykokolllösung ausgeführt, und zwar in gleicher Weise wie beim vorherigen

Versuche. Auch hier gab es keinen Unterschied zwischen den beiden Versuchsreihen.

Der Einfluß des Cyankaliums wurde auch untersucht, und zwar wurden die Versuche in folgender Weise ausgeführt. Absteigende Mengen der 24 Stunden mit Zink oder Kupfer im Kontakt gestandenen Pepsinlösung mit destilliertem Wasser bis auf 1 ccm, + 0,5 ccm 0,1 proz. Cyankaliumlösung + 0,5 ccm n/10 Salzsäure + 2 ccm Gelatine. Auch hier gab es keinen Unterschied zwischen den beiden Versuchsreihen. Statt 0,1 proz. Lösung wurde dieser Versuch mit 0,5 ccm 1,0 proz. Cyankaliumlösung ausprobiert. Aber durch die alkalische Reaktion wird die Pepsinwirkung ganz aufgehoben und der Versuch gelingt daher nicht.

Auf die negativen Reaktivierungsversuche möchten wir keinen besonderen Wert legen. Schon vor längerer Zeit hat *Hata*[1]) in *Jacobys* Laboratorium gezeigt, daß bei der Reaktivierung des durch Sublimat inaktivierten Pepsins methodische Schwierigkeiten dadurch entstehen, daß die Pepsinprüfung bei saurer Reaktion vorgenommen werden muß. Dadurch werden die Reaktionsbeziehungen zwischen Enzym, Metallen und komplexbildender Substanz so beeinflußt, daß das Mißlingen der Reaktivierung nichts beweist.

Daß sich Kobalt und Nickel gegenüber dem Pepsin verschieden verhalten, ist von Interesse. Das entspricht auch chemischen Erfahrungen. Bekanntlich bilden Kobalt und Nickel z. B. mit Cyankalium durchaus voneinander verschiedene komplexe Verbindungen.

Die Ergebnisse dieser Versuche lassen sich kurz zusammenfassen: Pepsin zeigt eine Empfindlichkeit für Zink und Kupfer und etwas weniger für Eisen und Kobalt und keine für Nickel.

---

[1]) *S. Hata*, diese Zeitschr. **17**, 1909.

Über die Bedeutung des Glykokolls und des Cyankaliums für die Ureasewirkung.

Von

Tetsugora Takahata.

(Aus dem biochemischen Laboratorium des Krankenhauses Moabit in Berlin.)

(Eingegangen am 5. Juni 1923.)

Mit der Auffindung der Auxowirkungen der Aminosäuren und des Cyankaliums auf die Sojaurease haben *Jacoby* und seine Mitarbeiter ein Forschungsgebiet erschlossen, das bei der weiteren Durcharbeitung zu immer neuen Befunden führt. In dieser Arbeit sollen Beobachtungen geschildert werden, welche auf quantitative Wirkungsbedingungen neues Licht werfen und zugleich für die Fragen der Inaktivierung der Enzyme durch Metalle und der Reaktivierung durch Cyankalium und Aminosäuren von Bedeutung sind.

Die Untersuchungen wurden mit einem sehr wirksamen, amerikanischen Ureasepräparat ausgeführt, das aus Jackbohnen dargestellt war. Die Untersuchungsmethode war die gleiche, welche in den Arbeiten aus *Jacobys* Laboratorium früher angewandt war.

Zunächst soll gezeigt werden, daß die Urease schon in ganz enormen Verdünnungen, die selbst bei dem hochwirksamen Präparat ohne irgendwie erhebliche Wirkung sind, durch den geringfügigen Zusatz von 2 mg Cyankalium befähigt werden, eine erhebliche Wirkung zu entfalten.

Bei diesen Versuchen war das Volumen der Versuchslösungen immer das gleiche, und zwar wurden immer gemischt 20 ccm Harnstofflösung (2%) mit 2 ccm Cyankalium (0,1%), die in den Kontrollen durch Wasser ersetzt wurden. Dazu kamen 10 ccm Ureaselösung der angegebenen Konzentration, so daß also die Konzentration des Gemisches nur etwa 30% der angegebenen Prozentzahl beträgt. Immer Zusatz von 0,5 ccm Toluol und 0,3 ccm Olivenöl. Versuchsdauer 20 Stunden.

Prozentgehalt der zugesetzten Ureaselösung	Ohne Cyankalium	Mit 2 mg Cyankalium	Prozentgehalt der zugesetzten Ureaselösung	Ohne Cyankalium	Mit 2 mg Cyankalium
0,3	125,3	130,4	0,015	2,4	69,2
0,3	118,7	120,15	0,01	4,2	65,3
0,03	13,6	128,7	0,01	1,5	50,2
0,03	3,5	105,0	0,006	2,8	44,2
0,02	11,5	98,0	0,001	1,5	7,1
0,02	2,9	83,8	—	1,0	2,0
0,017	10,3	81,0	—	1,2	2,0
0,017	2,5	72,5	—	1,5	2,6
0,015	8,0	74,0			

In den ersten Versuchen von *Jacoby* waren die Ausschläge der Cyankaliumversuche noch klein, weil die Ureasekonzentrationen noch zu groß waren, um große Unterschiede zu ergeben. In späteren Arbeiten konnte schon unter anderen Versuchsbedingungen von größeren Ausschlägen berichtet werden. In meinen Versuchen sind die Ausschläge um so bedeutender, je kleiner die Fermentmenge war. Mit Glykokoll habe ich nur wenige Versuche gemacht. Aber es bestehen zahlreiche Erfahrungen im hiesigen Laboratorium, die zeigen, daß die Aminosäuren ganz wie das Cyankalium imstande sind, die Wirkung kleinster Ureasemengen manifest zu machen.

Wenn man sieht, daß schon kleinste Ureasemengen durch Cyankalium oder Glykokoll aktiviert werden, so muß man sich fragen, welche Bedeutung das für die Frage der Metallinaktivierung der Urease und der Reaktivierung durch Cyankalium und Glykokoll hat. Da ja *Jacoby* gezeigt hat, daß immer ein aktiver Enzymrest neben dem inaktivierten Enzym bestehen bleibt, so wäre es ja denkbar, daß dieser Rest in vergrößertem Maßstabe durch die Auxostoffe zur Geltung kommt. Dann muß man aber annehmen, daß Cyankalium und Glykokoll in gleicher Weise wirken werden, ganz gleich, ob es sich um Metallinaktivierungen handelt, bei denen die eine oder die andere Auxosubstanz imstande ist, mit dem Metall komplexe Verbindungen einzugehen.

Nun liegt schon in *Jacobys* Versuchen geeignetes Material zur Prüfung dieser Frage vor. Es hatte sich gezeigt, daß die Quecksilbersublimat-Inaktivierung durch Cyankalium, aber nicht durch Glykokoll überwunden werden kann, während z. B. die Kupfervergiftung durch beide Substanzen reaktiviert werden kann. Ich habe diese Frage noch eingehender untersucht und insbesondere auch hier die quantitativen Verhältnisse im einzelnen studiert.

Zunächst sei in einem Versuche gezeigt, daß bei Inaktivierung der Urease mit einer kleinen Quantität Kupfersulfat eine Reaktivierung sowohl mit Cyankalium wie mit Glykokoll gelingt.

Es werden gelöst 0,004 g Kupfersulfat und 0,005 g Urease in 3 ccm Wasser. Nach einer Stunde werden die übrigen Reagenzien zugefügt, und zwar immer Harnstoff 1,6 g, Toluol 0,5, Olivenöl 0,3 g, Wasser bis zu einem Gesamtvolumen von 50 ccm. Außerdem wechselnde Zusätze von Glykokoll und Cyankalium.

Glykokoll g	Cyankalium g	Resultat
	2	20,7
	0,2	70,2
	0,02	143,6
	0,002	45,3
2		306,1
0,2		59,1
0,02		33,1
—	—	4,5

4,5 ist also der Wert, der bei der Kupfersulfat-Inaktivierung übrigbleibt. Man erkennt, daß man mit beiden Substanzen (Glykokoll und Cyankalium) eine Reaktivierung erzielt. Beim Cyankalium erkennt man ein deutliches Optimum. Das steht in Übereinstimmung mit dem Befunde *Jacobys*, daß größere Dosen Cyankalium die Urease schädigen.

Es werden gelöst 0,0005 g $HgCl_2$ und 0,005 g Urease in 2 ccm Wasser. Durch Zufügung von Phosphatpuffern wird p_H 7,0 sichergestellt. Sonst ganze Anordnung wie im vorigen Versuch.

Glykokoll g	Cyankalium g	Resultat
	0,5	258,2
5		24,2
—	—	8,8

Es werden gelöst 0,0002 g $HgCl_2$ und 0,005 g Urease in 2 ccm Wasser. Sonst alles wie oben, der Versuch wurde gemeinsam mit dem vorigen angestellt.

Glykokoll g	Cyankalium g	Resultat
—	0,5	273,9
1		9,2

Man erkennt also die geringfügige Wirkung selbst ungeheuerer Glykokolldosen, die ohne weiteres als Auxowirkung auf den Enzymrest erklärt werden können, während Cyankalium eine intensive Wirkung ausübt.

$HgCl_2$ 0,00001, Urease 0,005.

Glykokoll g	Cyankalium g	Resultat
	0,2	175,2
	0,02	101,3
	0,002	188,3
	0,0002	218,4
15		205,4
2		22,4
0,2		5,1

Es folgen nun einige Versuche, bei denen wir mit der Quecksilberdosis sehr heruntergingen.

Glykokoll g	Cyankalium g	Resultat
$HgCl_2$ 0,000002, Urease 0,005.		
	0,02	240,3
2,5		217,5
—	—	6,3
$HgCl_2$ 0,000001, Urease 0,01.		
	0,002	264,3
0.25		41,1
1.5		262,4
—	—	41,1

Wendet man größere Metallmengen zur Inaktivierung an, so mißlingt beim Kupfersulfat die Reaktivierung mit Cyankalium, während sie mit Glykokoll immer möglich bleibt. Bei der Sublimatinaktivierung ist bei den großen wie bei den kleinen Dosen eine Reaktivierung mit Cyankalium zu erreichen, mit Glykokoll nicht ausführbar.

Es werden 0,008 g Kupfersulfat mit 0,005 g Urease in 3 ccm Wasser gelöst. Außer den üblichen Zusätzen kommen in jede Probe 0,8 g Harnstoff. Das Gesamtvolumen beträgt 50 ccm.

Glykokoll g	Cyankalium g	Resultat
	0,02	9,5
0,3		68,2
1,0		74,3
2,0		74,8
—	—	2,0

Derselbe Versuch ohne Kupfersulfat ergab mit 0,3 g Glykokoll 139,5.

0,001 $HgCl_2$, 0,005 g Urease, sonst wie voriger Versuch.

Glykokoll g	Cyankalium g	Resultat
0,3		1,3
	0,0002	2,4
	0,002	15,6
	0,02	78,9
	0,5	20,1
—	—	1,4

Derselbe Versuch ohne $HgCl_2$ ergab mit 0,002 g Cyankalium 191,5.

Wir sehen also, daß bei größeren Kupferdosen die angewandte Cyankaliummenge nur einen mäßigen, wenn auch sicheren Effekt erzielt. Glykokoll versagte gegenüber $HgCl_2$ vollständig. Als Nebenbefund ergeben die Versuche wieder die enorme Auxowirkung von Glykokoll und Cyankalium.

Anhangsweise sei noch ein Versuch wiedergegeben, welcher zeigt, daß NaCN wie KCN wirkt, während KSCN kaum eine Wirkung hervorruft.

Überall 0,005 g Urease, Harnstoff 1,6 g, Gesamtvolumen 50 ccm.

NaCN g	KSCN g	Resultat
0,2		130,2
0,0002		151,4
	5	20,5
	0,5	7,5
	0,05	4,6

Über Auxostoffe und künstliche Zymogene.

Von

Martin Jacoby.

(Aus dem biochemischen Laboratorium des Krankenhauses Moabit in Berlin.)

(Eingegangen am 5. Juni 1923.)

Nachdem nunmehr zahlreiche neue Erfahrungen auf dem Gebiete der von mir aufgefundenen Auxostoffe der Urease (Aminosäuren, Cyankalium) vorliegen, halte ich es für notwendig, einige Gesichtspunkte zusammenfassend zu beleuchten.

Immer wieder habe ich die Unverbindlichkeit des Ausdruckes „Auxostoffe" betont, weil ich mir theoretisch und experimentell bewußt war, daß der Mechanismus offenbar nicht ganz einfach sein kann. Viele Möglichkeiten waren ins Auge gefaßt worden. Zunächst hatte man an p_H-Wirkungen gedacht. Das ist aber nach meinen eigenen sowie anderer Erfahrungen, z. B. von *Rockwood* und *Husa*[1]), von *Takahata*[2]) ausgeschlossen. Dann hat man Kolloidschutz des Enzyms [*Nakagawa*[3])] angenommen. Endlich ist die Möglichkeit erörtert worden, daß Verbindungen von Harnstoff und Glykokoll zunächst entstehen, die dann erst der Ureasewirkung zugänglich sein sollen [*Kato*[4])]. Übrigens ist die Annahme einer Verbindung von Harnstoff und Aminosäuren, welche dann erst von der Urease angegriffen wird, bereits von mir und *Umeda*[5]) erwogen worden. Wir haben ausdrücklich in unserer

[1]) Journ. of biol. Chem. **55**, 5—6, Nr. 2, 1923.

[2]) Dieses Heft.

[3]) Mitt. a. d. med. Fak. d. Kais. Univers. Tokio **28**, 383—427, H. 2,1922.

[4]) Diese Zeitschr. **136**, 498, 1923. Auf diese Arbeit gehe ich wegen ihrer Entstehungsweise nur notgedrungen ein. Die Arbeit ist in meinem Laboratorium auf meine Anregung und mit meinen Präparaten begonnen worden. Herr *Kato* kam zu theoretischen Anschauungen, die ich weder damals noch heute für hinreichend experimentell bewiesen halte. Da er mit meinem Vorschlag, die Versuche aus meinem Laboratorium, die Theorie aber gesondert unter eigener Verantwortung zu veröffentlichen, nicht einverstanden war, verließ er das Laboratorium, indem er mir die Protokolle seiner Versuche zur Weiterführung der Arbeit überließ. Er siedelte dann in ein anderes Laboratorium über, dessen Leiter zwar ausdrücklich mir gegenüber versicherte, er würde das Thema nicht bearbeiten lassen, trotzdem es aber gestattete und sogar erlaubte, daß in meinem Laboratorium ausgeführte Versuche, ohne es zu erwähnen, von dort aus publiziert wurden.

[5]) Diese Zeitschr. **68**, 23, 1915.

Arbeit vermerkt, daß wir nach der Vorschrift von *Lippich* Uraminoverbindungen von Glykokoll und Leucin dargestellt haben, aber eine Ureasewirkung auf diese Substanzen nicht nachweisen konnten. Natürlich halte ich es nicht für unmöglich, daß in Zukunft jemandem der Beweis für diese zuerst von mir diskutierte Möglichkeit glücken könnte. Aber jedenfalls ist die Aufstellung dieser Hypothese, nachdem sie bereits von mir und *Umeda* experimentell erörtert worden ist, nicht mehr neu. Daß Auxostoffe in wechselnder Menge in den Enzympräparaten vorkommen, war von mir stets vermutet worden. Auch diese Annahme ist von *Kato* nur übernommen worden.

Nach den Befunden meines Laboratoriums (*Takahata* u. a.), wonach allerkleinste Mengen Enzym durch Aminosäuren und Cyankalium manifest und sehr wirksam werden, sind jedenfalls die Auxostoffe als etwas Wesentliches zu betrachten. Es besteht durchaus die Möglichkeit, die auch zu keiner Behauptung meinerseits im Gegensatz steht, daß die Auxostoffe auch irgendwie Schutzwirkungen gegenüber dem Enzym ausüben. Das haben für die von mir und *Margarete Falk* entdeckte Serumwirkung bereits *Rona* und *György*[1]) diskutiert, *Nakagawa* macht diese Annahme für die Aminosäuren; *Willstätter* betont neuerdings sehr die Bedeutung von Schutzstoffen zur Erhaltung des Kolloidcharakters von Enzymen. *Sherman*[2]) hat für den Schutz, den die Aminosäuren der Pankreasamylase gewähren, angenommen, daß sie als Spaltungsprodukte den Zerfall des enzymatisch wirksamen Eiweißmoleküls hemmen. Ohne jeden Grund nimmt *Nakagawa* an, daß ich Auxostoffe mit Aktivatoren identifiziere und polemisiert gegen eine derartige Gleichstellung. Das ist ein Mißverständnis. Denn gerade weil ich das nicht annehme, habe ich ja einen neuen Namen gewählt.

Klarheit über die Auxostoffe muß man noch aus einem anderen Grunde zu gewinnen versuchen. Seitdem auch *Euler* und seine Mitarbeiter die Inaktivierung und Reaktivierung von Enzymen zum Gegenstand erfolgreicher Untersuchungen gemacht haben, hat dieses von mir und meinen Schülern erschlossene Gebiet sehr an Interesse gewonnen. Nun wird die Urease gerade durch diejenigen Substanzen reaktiviert, welche zugleich Auxostoffe der Urease sind. *Euler* hat sogar gelegentlich erwogen, als noch nicht so reiches, experimentelles Material wie heute vorlag, ob nicht die Cyankaliumwirkung überhaupt auf einer Beseitigung von Metallspuren in den Enzympräparaten beruhen könnte.

Wenn man sieht, daß kleinste Mengen Enzym durch die Auxostoffe manifest werden, und bedenkt, daß immer ein kleiner Rest Enzym

---

[1]) Diese Zeitschr. **117**, 115, 1920.

[2]) Proc. of the nat. acad. of sciences (U. S. A.) **9**, 81, Nr. 3, 1923.

neben dem inaktivierten aktiv bleibt, so könnte man sich vorstellen, daß die Aktivierung durch die Auxostoffe einfach in einer Wirkungsverstärkung des aktiv verbliebenen Enzymrestes besteht. Diese verlockende Hypothese, welche — zunächst für die Urease — die Annahme reversibler Metallverbindungen der Enzyme, der von mir sogenannten „künstlichen Zymogene" überflüssig machen würde, ist aber mit den beobachteten Tatsachen nicht in Einklang zu bringen. *Takahata* hat in Bestätigung und Erweiterung meiner früheren Befunde in der dieser Mitteilung vorangehenden Arbeit gefunden, daß Cyankalium, das mit Sublimat komplexe Verbindungen eingeht, durchaus geeigneter ist zur Reaktivierung des durch Sublimat inaktivierten Enzyms als die Aminosäuren. *Hata* hat schon vor vielen Jahren in meinem Laboratorium ausführlich alle Möglichkeiten durchuntersucht. Wer seine Arbeit studiert, kann nicht bezweifeln, daß die durch Metall inaktivierten Enzyme auch durch Stoffe ohne jede Auxowirkung reaktiviert werden. Endlich sei auf die wichtigen Untersuchungen von *Euler* und *Svanberg* über die Invertininaktivierung und Reaktivierung hingewiesen, welche auf anderen Wegen ebenfalls zu der Erkenntnis gelangten, daß sich bei der Inaktivierung reaktivierbare Enzymverbindungen bilden. Immer wieder möchte ich betonen, daß wir uns über den Angriffspunkt der inaktivierenden Substanz im gesamten Enzymwirkungskomplex nicht äußern können, bevor die Konstitution nicht bekannt oder wenigstens weiter als bisher vorauszusehen ist. Das zu unterstreichen, ist mancher schnellen Betrachtung gegenüber noch nicht überflüssig.

Vorläufig sehe ich also keinen Grund ein, irgendwie die zwei experimentell aufgefundenen und präzis demonstrierten Tatsachen einzuschränken, daß es erstens Auxostoffe der Enzyme gibt und daß außerdem die Enzyme inaktive, reaktivierbare Verbindungen eingehen, welche ich — wie ich glaube, in berechtigter, physiologischer Voraussicht — künstliche Zymogene genannt habe. Ich möchte diese Ausführungen nicht schließen, ohne auf eine neue experimentelle Gelegenheit zur weiteren Klärung hinzuweisen. Bekanntlich hat *Margarete Falk* in meinem Laboratorium gefunden, daß auf die Urease der Robinia pseudacacia die Sojaauxostoffe nicht einwirken. *Nakagawa* hat das bestätigt. Man wird nun versuchen können, die künstlichen Zymogene der Robiniaurease darzustellen und sie zu reaktivieren. Diese Untersuchungen werden sicherlich das Problem fördern. Sie auszuführen, soll meine Aufgabe sein sobald mir die notwendigen Mittel zu weiteren Forschungen zur Verfügung stehen werden.

Über die Reinigung der Fumarase.

Von

Mitsutaro Tsuchihashi.

(Aus dem biochemischen Laboratorium des Krankenhauses Moabit in Berlin.)

(Eingegangen am 5. Juni 1923.)

Im Anschluß an die Untersuchungen von *Batelli* und *Stern*[1]) habe ich auf Anregung von Herrn Professor *M. Jacoby* einige Versuche gemacht, die Fumarase der Leber ein wenig zu isolieren.

In der Methodik des Fumarsäurenachweises, der für diese Arbeit nur ein orientierender zu sein brauchte, gingen wir ganz nach *Batelli* und *Stern* vor, da das einfache Verfahren der Autoren für unsere Zwecke genügte.

Methodisches.

Die Bestimmung der Wirksamkeit des Ferments wird in folgender Weise ausgeführt:

1 g Fumarsäure wird in 8,5 ccm 2 n NaOH unter Erwärmen gelöst, mit n/10 H_2SO_4 neutralisiert und mit destilliertem Wasser bis auf 50 ccm aufgefüllt. Mit je 5 ccm dieser so hergestellten Fumarsäurenatronlösung werden absteigende Mengen der zu prüfenden Lösung versetzt und 15 Minuten im Brutofen bei 37° C stehengelassen. Nach Ablauf dieser Zeit werden diese Gemische, mit 2 ccm 1,75 proz. Formalinlösung versetzt, sofort aufgekocht und filtriert. Die gewonnenen klaren Filtrate werden mit je 3 ccm Alkohol absolut. und dann mit 5 ccm Eisenchlorid versetzt. Die durch übriggebliebene Fumarsäure hervorgerufenen Niederschläge werden in graduierten Zentrifugiergläschen stark zentrifugiert. Die Mengen der Niederschläge werden durch die Skala der graduierten Gläschen ungefähr in Kubikzentimetern ausgedrückt.

Experimentelles.

Als Ausgangslösung wird gepulverter Leberextrakt — hergestellt aus Menschenleber — benutzt. Die Pulver werden z. B. in folgender Weise hergestellt: 190 g klein gehackte und möglichst blutfreie Leber

---

[1]) Soc. de Biol. 1921, S. 305.

werden mit 190 ccm destilliertem Wasser und etwa 4 ccm Toluol versetzt, ordentlich durchgemischt und etwa 24 Stunden im Eisschrank stehengelassen. Danach wird die Mischung koliert und die erhaltene trübe, dunkelbraune Lösung im *Faust-Heim*schen Apparat getrocknet. Das erhaltene Pulver wiegt 47,6 g. Das Pulver löst sich im Wasser vollständig. Die Wirksamkeit desselben ist folgende. Es wird 1 proz. in destilliertem Wasser gelöst und zum Teil filtriert und zum Teil unfiltriert geprüft.

ccm	Unfiltriert	Filtriert
2,0	0,4	0,4
1,0	2,5	2,2
0,5	4,3	4,2
0	5,9	—

Wie ersichtlich ist, ist die Pulverlösung wirksam. Die Extraktion dauerte immer 24 Stunden, denn dabei ist die Wirksamkeit am größten, wie aus dem nächsten Versuche hervorgeht.

50 g gehackte Leber werden mit 50 ccm destilliertem Wasser und 2 ccm Toluol versetzt und ordentlich durchgeschüttelt. Ein Gemisch wird nach 10 Minuten und ein zweites nach 24stündigem und ein drittes nach 48stündigem Aufbewahren im Eisschrank koliert. Die Wirksamkeit dieser kolierten Lösungen ist folgende:

ccm	10 Minuten	24 Stunden	48 Stunden
2,0	schwache Trübung	schwache Trübung	schwache Trübung
1,0	1,3	0,8	0,8
0,5	3,5	2,9	3,0
0	5,9	5,8	5,9

Zuerst habe ich versucht, das Ferment mit Methylalkohol zu reinigen. Zu diesem Zwecke wurde eine 1 proz. Pulverlösung mit einer gleichen oder doppelten Menge von Methylalkohol versetzt und der erhaltene Niederschlag in destilliertem Wasser aufgeschwemmt und abfiltriert. Die erhaltene klare, blaßgelbe Lösung wurde sofort oder getrocknet untersucht. Aber die Resultate waren nicht befriedigend. Nach diesem Versuche habe ich die fraktionierte Aussalzung des Ferments mit Ammonsulfat versucht, und zwar zuerst die Fraktionierung mit 33-, 50- und 100proz. Sättigung ausgeführt.

5,0 g Pulver werden in 50 ccm destilliertem Wasser gelöst und abfiltriert. 30 ccm dieses Filtrats werden mit 14,8 ccm gesättigter Ammonsulfatlösung versetzt (33 proz. Sättigung) und nach 1 Stunde abfiltriert. Das Filtrat ist dunkelbraun und beträgt 43 ccm (Filtrat 1). Der Niederschlag wird zwischen Filtrierpapier gut gepreßt und mit 30 ccm destilliertem Wasser versetzt. Es löst sich schlecht. Es wird abfiltriert. Das erhaltene Filtrat ist klar blaßgelb, zeigt aber später eine schwache Trübung (Fraktion I).

Das Filtrat 1 (= 43 ccm, welches also aus 28,8 ccm Pulverlösung und 14,2 ccm gesättigter Ammonsulfatlösung besteht) wird mit 14,6 ccm gesättigter Ammonsulfatlösung versetzt (50 proz. Sättigung) und nach 1 Stunde abfiltriert. Ein klares braunes Filtrat wird in einer Menge von 50 ccm erhalten (Filtrat 2). Der Niederschlag wird ebenfalls zwischen Filtrierpapier getrocknet und mit 28,8 ccm destilliertem Wasser versetzt. Er löst sich fast vollständig. Es wird abfiltriert. Das erhaltene Filtrat ist klar braun, aber später tritt eine schwache Trübung ein (Fraktion II).

Das Filtrat (50 ccm, welches aus 25 ccm Pulverlösung und 25 ccm gesättigter Ammonsulfatlösung besteht) wird mit Ammonsulfatpulver auf vollständige Sättigung gebracht und nach 1 Stunde abfiltriert. Der Niederschlag wird ebenfalls zwischen Filtrierpapier getrocknet und in 25 ccm destilliertem Wasser gelöst. Er löst sich fast vollständig. Er wird filtriert. Das Filtrat ist anfangs klar braun, aber zeigt später auch eine schwache Trübung (Fraktion III). Die Fraktionen zeigen die folgenden Wirksamkeiten:

ccm	Fraktion I (33% Sättigung)	Fraktion II (50% Sättigung)	Fraktion III (100% Sättigung)
15,0	3,9	—	2,3
5,0	5,4	schwache Trübung	4,0
3,0	—	2,0	5,2
0	6,1	5,9	6,0

Wie aus dieser Tabelle ersichtlich ist, geht das Ferment zum größten Teil in den Niederschlag bei 50proz. Sättigung über, aber in den anderen Niederschlägen ist ebenfalls eine schwache fermentative Wirksamkeit zu beobachten. Weiter ist die Fraktionierung durch 30-, 65- und 100proz. Sättigung von Ammonsulfat ausgeführt worden.

70 ccm einer 1 proz. filtrierten Pulverlösung werden in gleicher Weise wie oben behandelt. Dabei löst sich der Niederschlag bei 30proz. Sättigung im Wasser fast nicht, dagegen die anderen Niederschläge fast vollständig; aber nachher weisen diese klaren Lösungen eine schwache Trübung auf.

ccm	Fraktion I (30% Sättigung)	Fraktion II (65% Sättigung)	Fraktion III (100% Sättigung)
5,0	6,3	—	—
2,0	6,2	1,4	5,0
1,0	—	3,4	5,6
0	6,2	6,2	6,0

Wie ersichtlich ist, findet sich die größte Menge des Ferments in der Fraktion zwischen 30- und 65proz. Sättigung, aber noch etwas in der Fraktion zwischen 65- und 100proz. Sättigung.

In einem weiteren Versuche habe ich die Fraktionierung durch 30-, 85- und 100proz. Sättigung ausgeführt.

35 ccm einer 1 proz. filtrierten Pulverlösung werden in gleicher Weise wie oben behandelt. Der Niederschlag bei 30 proz. Sättigung löst sich im Wasser fast nicht, dagegen derjenige bei 85 proz. Sättigung fast vollständig.

Nach 85 proz. Sättigung der Lösung ruft Ammonsulfat keine merkbare Trübung mehr hervor.

ccm	Fraktion I (30% Sättigung)	Fraktion II (85% Sättigung)
5,0	6,3	—
1,0	—	2,8
0,5	—	4,3
0	6,1	6,1

Wie ersichtlich ist, wird das Ferment fast vollständig durch die 30- bis 85proz. Sättigung des Ammonsulfats ausgesalzen. Diese Lösung zeigt eine braune Farbe und ist anfangs klar, aber nachher tritt eine schwache Trübung ein. Am folgenden Tage wird diese getrübte Lösung, zum Teil filtriert und zum Teil unfiltriert, geprüft.

ccm	Unfiltriert	Filtriert
2,0	0,7	1,4
1,0	3,0	3,5
0	6,0	—

Diese Lösung wird mit ein paar Tropfen Toluol versetzt und in einer Flasche im Eisschrank aufbewahrt. Nach etwa 2 Wochen besitzt diese Lösung noch eine gewisse Wirksamkeit, wie aus der nächsten Tabelle hervorgeht. Dabei ist die Lösung stark getrübt, daher wird sie abfiltriert.

ccm	Filtriert
2,0	2,4
1,0	4,3
0	5,9

Die Fermentlösung, welche mit 30- bis 85proz. Sättigung des Ammonsulfats ausgesalzen und in Wasser gelöst war, wird gepulvert und geprüft:

19,0 g Pulver werden in 190 ccm Wasser gelöst. Die erhaltene trübe Lösung beträgt 202 ccm. Dazu kommen 86,6 ccm gesättigte Ammonsulfatlösung (30 proz. Sättigung), der Niederschlag wird abfiltriert. Das erhaltene Filtrat (= 230 ccm) wird mit 843,3 ccm gesättigter Ammonsulfatlösung versetzt und nach 1 Tage abfiltriert. Der Niederschlag wird mit 85 proz. Ammonsulfatlösung ausgewaschen, zwischen Filtrierpapier getrocknet und in 161 ccm destilliertem Wasser gelöst. Er löst sich fast vollständig. Er wird abfiltriert. Das Filtrat beträgt 172 ccm, und ein Teil wird sofort geprüft.

ccm	Filtriert
2,0	1,3
1,0	3,2
0,5	4,7
0	6,2

Ein anderer Teil dieser Lösung (= 160 ccm) wird im *Faust-Heim*schen Apparat getrocknet. Das Pulver beträgt 10,3 g.

1,0 g dieses Pulvers wird in 20 ccm destilliertem Wasser gelöst. Es löst sich nicht vollständig. Diese Pulverlösung wird, zum Teil filtriert und zum Teil unfiltriert, geprüft.

ccm	Unfiltriert	Filtriert
2,0	5,0	4,8
1,0	5,2	5,0
0,5	5,8	6,1
0	6,2	6,3

Wie ersichtlich ist, hat die Fermentlösung durch die Trocknung stark an Wirksamkeit eingebüßt. Dieses Pulver löst sich auch schlecht in Kochsalzlösung, und die filtrierte Lösung wirkt ebenso schlecht.

Über die Bildung der Bakterienurease.

Von

Tetsugora Takahata.

(Aus dem biochemischen Laboratorium des Krankenhauses Moabit in Berlin.)

(Eingegangen am 5. Juni 1923.)

Jacoby[1]) hat gefunden, daß Zusatz von Eiweißleucin zu Kulturen von Proteusbakterien eine Steigerung der Ureasebildung bewirkt. Benutzt man Kulturen, die in mehreren Generationen auf eiweißfreiem Nährboden von bekannter, einfacher Zusammensetzung gewachsen waren, kommt eine irgendwie erhebliche Ureasebildung überhaupt erst nach dem Leucinzusatz zustande. Mit anderen Aminosäuren war der Effekt nicht erzielbar. Um den Fund weiter zu analysieren, erschien es wünschenswert, zu prüfen, wie die Ureasebildung unter dem Einfluß von Leucin von p_H abhängig ist. Diese Untersuchung habe ich auf Veranlassung von Herrn Professor *Jacoby* ausgeführt.

Durch Zusatz von *Sörensen*schem Phosphatgemisch wurde p_H variiert und untersucht, inwiefern dadurch die Ureasebildung beeinflußt wird.

Die Kulturen waren auf folgendem Nährboden, den auch *Jacoby* angewandt hatte, gezüchtet worden: 6 g Chlornatrium, 0,4 g Magnesiumsulfat, 0,5 g Dikaliumphosphat, 0,05 g Chlorcalcium, 4 g asparaginsaures Natrium und 3 g milchsaures Natrium auf 1 Liter Wasser.

Es wurden immer gemischt 20 ccm Phosphatmischung (m/15), 1 ccm Kultur, 10 ccm Wasser, die 0,05 g Leucin (aus Eiweiß) enthielten, in den Kontrollen dafür 10 ccm Wasser, 20 ccm Harnstofflösung (2 proz.). Jeder Probe wurden 0,3 ccm Olivenöl gegen das Schäumen der Flüssigkeit zugefügt. Brutschrankdauer 20 Stunden.

Zunächst wurde bei einer Kultur, die auf dem oben erwähnten Nährboden 5 Tage gewachsen war, $p_H = 7,2$ festgestellt und dann die Ureasebildung bestimmt. Man erhielt:

Mit Leucin 38,9 Ohne Leucin 4,4.

[1]) Diese Zeitschr. 81, 332, 1917.

Dann wurde bei einer sechstägigen Kultur mit Phosphatmischungen verschiedene p_H hergestellt. Es ergab sich:

p_H	Mit Leucin	Ohne Leucin
8,302	31,1	3,55
6,976	48,65	8,25
4,529	35,05	2,25

Drei weitere Versuche zeigen die Abhängigkeit von p_H. Sie sind alle mit Leucin angesetzt.

p_H	I	II	III	p_H	I	II	III
8,302	35,45	32,25	36,1	6,976	43,95	42,9	48,4
8,038	38,35	35,35	38,95	6,239	41,25	—	47,0
7,648	39,9	38,95	46,8	4,529	33,9	29,95	35,1

Es zeigt sich also, daß die Ureasebildung ihr Optimum beim Neutralpunkt hat, von dem sie nach beiden Seiten nur langsam abfällt.

Über die Gewinnung einer Urease-Enzymlösung aus Bakterien.

Von

Tetsugora Takahata.

(Aus dem biochemischen Laboratorium des Krankenhauses Moabit in Berlin.)

(Eingegangen am 5. Juni 1923.)

Vor einigen Jahren hat *Jacoby*[1]) eine Methode beschrieben, aus Proteusbakterien ein Präparat darzustellen, das auch nach längerer Einwirkung von Toluol imstande war, Harnstoff zu spalten. Damit war im Prinzip gezeigt, daß man aus den Bakterien eine Urease gewinnen kann. In *Jacobys* Mitteilung wurden weitere Untersuchungen in Aussicht gestellt, die das Ziel verfolgen sollten, das Enzym in eine lösliche Form überzuführen. Dieser Aufgabe habe ich mich auf Aufforderung von Herrn Professor *Jacoby* unterzogen.

Die Züchtung der Proteusbakterien wurde wie bei *Jacobys* Versuchen in *Kolle*schen Flaschen auf Agar als Massenkultur vorgenommen. Wir verwandten einen Stamm, der sehr gut Harnstoff spaltet.

In der ersten Versuchsreihe haben wir die von dem Agar abgeschabten Bakterien auf Tontellern getrocknet.

0,25 g des so erhaltenen Pulvers wurden in 25 ccm *Sörensen*scher Phosphatmischung (p_H 7,65) aufgenommen. Nach 30 Minuten wird zentrifugiert, der Extrakt noch zweimal filtriert. Man erhielt hier, wie auch in den späteren Versuchen, eine sehr trübe Lösung. Die Ureaseprüfungen wurden immer mit Toluolzusatz ausgeführt.

10 ccm des Filtrats (entsprechend 0,1 g Pulver) ergeben	6,45
10 ccm des Filtrats mit Phosphat neutralisiert ergeben	33,40
Der Filterrückstand ergab	14,8

0,15 g desselben Pulvers werden in 15 ccm Phosphatmischung (p_H = 7,0) aufgenommen.

10 ccm Filtrat (= 0,1 g Pulver) ergeben	25,9
Der Filterrückstand ergab	9,1

---

[1]) Diese Zeitschr. 84, 354, 1917.

Bei den nächsten Versuchen wurden die Bakterien nicht auf Tontellern, sondern auf Glasschalen getrocknet.

0,25 g des Pulvers werden mit 50 ccm Phosphatmischung ($p_H = 7,65$) 15 Minuten extrahiert, zentrifugiert und zweimal filtriert.

20 ccm Filtrat (= 0,1 g) mit Phosphat neutralisiert 40,3

0,25 g des Pulvers werden mit 50 ccm Wasser 15 Minuten extrahiert, zentrifugiert und zweimal filtriert.

20 ccm Filtrat (= 0,1 g) 22,2

20 ccm Filtrat + 20 ccm Phosphatlösung ($p_H = 7,0$) 36,2

0,1 g Pulver extrahiert mit 20 ccm Phosphat ($p_H = 8,3$) 2 Stunden extrahiert usw.

Das Filtrat neutralisiert 40,5

Rückstand mit 20 ccm neutralem Phosphat . . . 60,2

0,1 g Pulver extrahiert 20 ccm Phosphat ($p_H = 7,0$) 2 Stunden usw.

Filtrat 39,6

Rückstand mit 20 ccm neutralem Phosphat . . . 59,1

0,1 g Pulver extrahiert mit 20 ccm Phosphat ($p_H = 4,53$) 2 Stunden usw.

Filtrat neutralisiert 37,2

Rückstand mit 20 ccm neutralem Phosphat . . . 56,9

Bei dem nächsten Versuch wurde ein besonders wirksames Pulver verwandt, das ebenfalls durch Trocknen in einer Glasschale gewonnen war.

0,1 g Pulver wurde mit *Sörensens* Glykokoll-NaOH-Mischung ($p_H = 8,93$) 2 Stunden extrahiert, wie immer zentrifugiert und zweimal filtriert.

Filtrat neutralisiert 95,2

Rückstand + 0,3 g Glykokoll 109,4

0,1 g Pulver 2 Stunden mit Wasser extrahiert usw.

Filtrat + 0,3 g Glykokoll 105,2

Rückstand ohne Glykokoll 72,7

Es ist also gelungen, Lösungen herzustellen, die eine gute Wirkung der Bakterienurease zeigen. Allerdings sind die Lösungen trübe. Aber da sie in toluolgesättigtem Zustande nach Zentrifugieren und zweimaligem Filtrieren wirksam sind, besteht kein Grund, daran zu zweifeln, *daß wir ein lösliches Enzym vor uns haben.*

Es scheint, daß die Extraktion des Enzyms bei verschiedener Reaktion der Flüssigkeit gelingt und die Wirkung durch verschiedene Zusätze verstärkt wird.

Mit Sicherheit gelang es uns nur, den getrockneten Bakterien das Enzym zu entziehen. Wenn wir flüssige Kulturen mit Chloroform

schüttelten oder mit Methylalkohol ausfällten, erzielten wir keine Wirkung. Nach Toluolzusatz zu flüssigen Kulturen wurde zwar noch eine kleine Wirkung erzielt, jedoch wurden diese Lösungen durch Filtration unwirksam. Anscheinend handelte es sich nur um die Wirkung von lebenden Bakterien, die der Toluolbehandlung widerstanden haben.

Aufgabe weiterer Untersuchungen wird es sein, aus den gut wirksamen Enzymlösungen die Bakterienurease mit geeigneter Methodik weiter zu isolieren.

Für die Versuche wurden Mittel verwandt, welche Herrn Prof. Dr. *Martin Jacoby* von der Hojimi-Hoshi-Stiftung in dankenswerter Weise zur Verfügung gestellt waren.

Über Bakterienkatalase. IV [1]).

Von

J. Hagihara aus Japan.

(Aus dem biochemischen Laboratorium des Krankenhauses Moabit in Berlin.)

(Eingegangen am 5. Juni 1923.)

In seinen Versuchen über Bakterienkatalase ist *Jacoby*[1]) von Nährböden einfacher und bekannter Zusammensetzung ausgegangen, auf denen er Proteusbakterien wachsen ließ. Aus den Kulturen konnten dann durch Fällung mit Methylalkohol Fermentpräparate dargestellt werden, welche eine gute Katalasewirkung hatten. Die Methylalkoholniederschläge wurden mit Wasser extrahiert und die Auszüge im *Faust-Heim*schen Apparat eingedunstet. Der N-Gehalt von drei so gewonnenen Präparaten betrug 10,1, 10,1 und 9,9%. Die Versuche wurden nur als Vorversuche angesehen und gleich hervorgehoben, daß es sich nur um eine vorläufige Orientierung handelt.

Auf Veranlassung von Herrn Professor *Martin Jacoby* habe ich die Versuche wieder aufgenommen, um mit Hilfe der Mikromethodik weiteres Material zur Frage der Zusammensetzung der Katalasepräparate beizubringen.

Wir ließen die Proteusbakterien wieder auf einem Nährboden von folgender Zusammensetzung wachsen: 6 g Chlornatrium, 0,4 g Magnesiumsulfat, 0,5 g Dikaliumphosphat, 0,05 g Chlorcalcium, 4 g asparaginsaures Natrium und 3 g milchsaures Natrium auf 1 Liter Wasser. Nach mehrtägigem Wachstum wurde mit der doppelten Menge Methylalkohol ausgefällt, die gewaschenen Niederschläge schnell in Wasser aufgenommen, die Extrakte am nächsten Tage nach Aufbewahrung im Eisschrank filtriert. Die Lösungen kamen dann direkt zur Unter-

[1]) *Martin Jacoby*, Über Bakterienkatalase I—III; diese Zeitschr. **89**, 350; **92**, 129; **95**, 124.

suchung. Es ist verständlich, daß die Präparate nicht gleichmäßig wirksam waren, da die Löslichkeit der Bakterienkatalase sehr labil ist und bei Verarbeitung größerer Quantitäten leicht Verluste eintreten. Die Wirksamkeit wurde jedesmal besonders bestimmt.

Die Katalasebestimmungen wurden in der Kälte vorgenommen, indem verschiedene Mengen der Fermentlösungen mit H_2O_2 30 Minuten zusammengebracht wurden. Die in den Tabellen wiedergegebenen Zahlen bedeuten die Menge zersetzten H_2O_2, ausgedrückt in n/10 Kaliumpermanganat, bezogen auf 100 ccm Fermentlösung. Die Zahlen sind durch Multiplikation aus dem 1 ccm-Wert mit 100 erhalten.

Die N-Bestimmungen wurden mit der Mikro-Kjeldahlmethode nach *Bang* ausgeführt. In den Tabellen sind die Versuche benutzt, bei denen die Wirksamkeit der Katalase während der Darstellung nicht zu erheblich abgenommen hat.

Präparat	Katalasewerte		% der ursprünglichen Wirkung	N in 100 ccm Lösung	
	Ausgangspräparat	Gereinigtes Präparat		Ausgangspräparat mg	Gereinigtes Präparat mg
I	440	370	84	34,72	1,015
II	420	260	62	34,16	0,735
III	530	410	77	30,66	1,06
IV	330	230	70	23,8	0,56

Für gleiche Katalasewerte (100) ergeben sich beim Ausgangsmaterial und bei den gereinigten Präparaten folgende N-Werte:

Präparat	Ausgangspräparat mg	Gereinigtes Präparat mg
I	7,89	0,274
II	8,13	0,283
III	5,79	0,256
IV	7,21	0,244

Berechnet man, wie groß die N-Zahlen sind, die den Katalasewerten der Ausgangspräparate entsprechen, so erhält man für die gereinigten Präparate von gleichem Katalasewert folgende Vergleichszahlen:

Präparat	Ausgangspräparat	Gereinigtes Präparat	% des ursprünglichen N
I	34,72	1,207	3,5
II	34,16	1,187	3,5
III	30,66	1,357	4,4
IV	23,8	0,804	3,5

Bei Präparat III und IV wurde der Trockengehalt und der Aschegehalt der Fermentlösungen bestimmt.

Es ergaben sich für 1 g aschefreie Trockensubstanz folgende *Katalasewerte*:

Präparat	Vor der Reinigung	Nach der Reinigung
III	1218	27 333
IV	805	23 000

Der N-Gehalt der aschefreien Substanz beträgt bei:

Präparat	Vor der Reinigung	Nach der Reinigung
III	7 %	7 %
IV	5,7%	5,6%

Bestimmungen nach *Soerensen* ergaben, daß in den Ausgangspräparaten etwa 91,5 % des N nach *Soerensen* bestimmbar ist, also als Aminosäuren- oder Ammoniak-N anzusehen ist. In den gereinigten Präparaten finden sich nur Spuren *Soerensen*-N.

Trockensubstanz und Asche.

	Vor der Reinigung	Nach der Reinigung
Trockensubstanz III	1,265	0,024
„ IV	1,3	0,03
Asche III	0,83	0,01
„ IV	0,89	0,02
Aschefreie Trockensubst. III	0,435	0,015
„ „ IV	0,41	0,01

Es ist also auf dem nach dem Vorgehen von *Jacoby* eingeschlagenen Wege gelungen, recht reine Präparate zu erhalten. Man erkennt, daß nur ein kleiner Teil der in den ursprünglichen Präparaten enthaltenen Substanzmengen mit dem Enzym in Beziehung steht. Von Interesse ist, daß der Aminosäuren- bzw. Ammoniak-N im wesentlichen nichts mit dem Enzym zu tun hat. Damit ist natürlich nicht ausgeschlossen, daß die geringen N-Mengen, die dem Enzym als solchem angehören können, trotzdem aus Aminosäuren-N bestehen.

In den neuen gereinigten Präparaten haben wir einen geringeren N-Gehalt in der aschefreien Trockensubstanz gefunden, als *Jacoby* sie bei seinen Präparaten festgestellt hatte. Man könnte darin den Ausdruck einer vorgeschrittenen Isolierung des Enzyms sehen. Wenn man aber beachtet, daß die Ausgangspräparate denselben N-Gehalt der aschefreien Trockensubstanz aufweisen, wie die gereinigten, aus ihnen dargestellten Präparate, so folgt daraus, daß man den N-Gehalt nicht hoch bewerten kann. Der wahre Ausdruck der erzielten Reinigung der Enzympräparate ist in der Verminderung der Asche zu erkennen. Vergleicht man, wieviel N und wieviel Asche vor und nach der Reinigung

auf die gleiche Katalasewirkung kommt, so erhält man einen Ausdruck des erzielten Fortschritts.

Auf den gleichen Katalasewert kommt nur 3,7 % des vorher vorhandenen N und nur 3,9 % der vorher vorhandenen aschefreien Trockensubstanz.

Jedenfalls sind wir zu sehr reinen und wirksamen Präparaten bei der Katalasebildung auf chemisch bekanntem Nährboden gelangt. Es ist nur eine Frage der Hilfsmittel des Laboratoriums, für weitere Isolierungen zu ausreichenden Substanzmengen reiner Präparate zu gelangen. Welche Wege dabei einzuschlagen sind, ist ja aus dem allgemeinen Stande der Forschung ohne weiteres ersichtlich. Es liegt nahe, sich an die von *Tsuchihashi*[1]) für die Blutkatalase angewandte Methodik anzulehnen.

---

[1]) Dieses Heft der Zeitschrift.

Über die Sekretion und Aktivität der Speichelamylase.

Von

Hans Pringsheim und Harald Gorodiski.

(Aus dem chemischen Institut der Universität Berlin.)

(Eingegangen am 4. Juni 1923.)

Mit 2 Abbildungen im Text.

Die Angaben der Literatur[1]) über die Sekretion der Speichelamylase beim Menschen sind recht unsicher und zum Teil widersprechend. Nicht nur die individuellen Schwankungen, sondern auch die Schwankungen in der amylolytischen Kraft des Speichels bei demselben Individuum sollen sehr beträchtlich sein. Wie wir in folgendem zeigen werden, sind diese Divergenzen sicherlich hauptsächlich auf die Fehlerquellen zurückzuführen, mit denen die Methode der Versuchsanstellung in den zurückliegenden Untersuchungen belastet war. Zum Teil erklären sich diese Fehler durch die seinerzeit nicht genügend entwickelte Kenntnis von der Beeinflussung der Enzymwirkung durch äußere Faktoren, vornehmlich durch die Aziditätsbedingungen, zum Teil sind sie auf eine ungeeignete Entnahme des Speichelsekrets zurückzuführen, nicht zum wenigsten dürfte endlich zu den Mißerfolgen die unsichere, auf das Verschwinden der Jodreaktion gegründete, Verfolgung des Stärkeabbaues zurückzuführen sein.

Wir haben diese Fehlerquellen vermieden, den Speichel beim Optimum seiner Wasserstoffionenkonzentration von $p_H = 6{,}2$ bei Gegenwart von Phosphatpuffern und in Anwesenheit der nötigen Kochsalzmenge auf die Stärke einwirken lassen und den Fortgang der Spaltung durch die Zuckerbildung bestimmt nach der *Bertrand*schen Methode, und in geeigneten Intervallen bis zu einer etwa 50proz. Spaltung der Stärke verfolgt. Anfangs fanden wir trotz dieser verläßlichen Versuchsanstellung Schwankungen in der Aktivität des Speichels, welche ein klares Ergebnis unserer Versuche zunichte gemacht hätten. Als wir jedoch dazu übergingen, den Speichel nach einem gleichartigen Frühstück, bestehend aus: zwei Schnitten Graubrot

---

[1]) Vgl. *F. N. Schulz* in *Oppenheimer*, Handb. d. Biochem. Bd. III, 1. Hälfte, S. 37.

(Markenbrot) mit Butter und zwei Tassen Kakao, nach Verlauf einer Stunde während 30 Minuten mit Hilfe eines Schwämmchens von Mandarinengröße zu sammeln, erzielten wir einerseits eine überraschend gute Übereinstimmung in der Menge des abgesonderten Speichels wie auch eine sehr gute Übereinstimmung der stärkespaltenden Aktivität von Durchschnittsproben, welche wir dem aufgesammelten Speichel entnahmen.

Diese Versuche wurden während mehrerer Wochen an zwei Versuchspersonen dem einen von uns (*Gor.*) und einem anderen, Herrn cand. chem. *Kurt Goldstein* (*God.*), der sich uns in dankenswerter Weise zur Verfügung stellte, ausgeführt; auch zwischen diesen beiden gleichaltrigen Personen mit gesunden Gebissen waren weder in der Speichelmenge, noch in der Aktivität wesentliche Unterschiede aufzufinden.

Nachdem wir so bei unseren beiden Versuchspersonen einen Standard der Sekretion und Aktivität des Speichels festgelegt hatten, gingen wir dazu über, den von zahnärztlicher Seite zur Erklärung klinischer Beobachtungen angenommenen Einfluß zu prüfen, der eventuell auf diese beiden Faktoren durch radioaktive Zahnputzmittel ausgeübt werden könnte. Zu diesem Zwecke wurden die Zähne kurz vor der Speichelentnahme während 2 Minuten mittels einer Zahnbürste, die mit einem 2 cm langen Stück einer inaktiven oder radioaktiven Zahnpaste bestrichen war, kräftig geputzt. Am Anfang führten wir diese Versuche mit dem so gewonnenen Speichel in zweitägigen Abständen aus, schließlich gingen wir dazu über, längere Intervalle von einer Woche eintreten zu lassen, wobei jedoch das Putzen mit der aktiven Paste alle Tage vorgenommen wurde; immer blieb das Resultat in bezug auf Sekretion und Aktivität das gleiche. Eine radioaktive Nachwirkung kann nicht eingetreten sein, da wir die Versuche bis zu sechs Wochen ausdehnten. An diesem Resultate wurde auch nichts geändert, als wir an Stelle der Paste mit 50 Macheinheiten pro Tube von 30 ccm ein sonst gleiches Präparat von zehnfacher radioaktiver Wirkungskraft während zweier Wochen benutzten.

Das Resultat unserer Feststellungen ist also ein durchaus übersichtliches und einheitliches. Es bleibt uns jetzt noch zu prüfen, ob in bezug auf Sekretion und Aktivität des Speichels regelmäßige Tagesschwankungen aufzufinden sein werden, und ob die Art der Nahrung von Einfluß auf diese beiden Faktoren ist. Wir kommen hierauf bald zurück.

Die Resultate unserer Versuche sind am besten aus den nachstehenden drei Tabellen zu entnehmen.

Die erste Tabelle enthält die Versuche, in denen wir in jedem einzelnen Falle auf einmal etwa $\frac{1}{2}$, 2 oder 4 ccm Speichel ohne Schwämmchen entnahmen; die zweite Tabelle enthält die Versuche der Person

Gor. und die dritte der Person *God.*; in diesen beiden Versuchsreihen wurde der Durchschnittsspeichelprobe immer ½ ccm Speichel entnommen.

Wir verwandten immer 50 ccm einer 2 proz. Lösung von löslicher Stärke (*Kahlbaum*) (auf absolut trockene Substanz berechnet) mit 2% Kochsalz und 20 ccm Phosphatpuffern[1]) bei Gegenwart von etwas

Tabelle I. Gor.
Normaler Speichel.

Datum	Entnommene Speichelmenge ccm	Maltose in %						
		5'	10'	15'	20'	30'	60'	90'
1. II.	2	37	53	61	66	69	73	75
3. II.	4	17	46	59	62	63	61	73
	4	21	47	59	66	67	75	(64)

Datum	Entnommene Speichelmenge ccm	Maltose in %						
		5'	10'	15'	20'	30'	40'	55'
6. II.	½	11	17	25	33	45	54	56
12. II.	½	10	11	14	17	21	28	35
13. II.	½	13	17	29	37	52	64	75

Tabelle II. Gor.

Datum	In 30 Minuten gesammelter Speichel ccm	Entnommene Speichelmenge ccm	Maltose in %						
			5'	10'	15'	20'	30'	40'	55'
		Ohne Paste							
14. II.	22½	½	15	22	29	37	47	49	65
15. II.	28	½	12	16	23	28	35	43	61
16. II.	21¼	½	6	14	21	29	40	52	65
17. II.	20	½	6	13	19	27	40	46	59
		Inaktive Paste							
19. II.	23¾	½	6	15	22	30	44	55	65
20. II.	19¾	½	7	15	23	30	45	52	65
		Paste mit 50 Macheinheiten							
21. II.	21½	½	6	15	22	27	38	50	64
22. II.	23	½	7	15	21	29	42	55	66
26. II.	20	½	4	15	19	25	38	46	60
5. III.	17	½	6	12	16	23	31	38	47
9. III.	31¼	½	6	15	20	28	40	55	63
15. III.	31½	½	8	18	24	33	48	59	66
22. III.	35¼	½	9	19	23	32	46	56	62
		Paste mit 500 Macheinheiten							
29. III.	26½	½	8	16	23	29	41	52	62
5. IV.	26	½	8	15	19	24	37	44	59

[1]) 3,8 ccm primäres Kaliumphosphat und 16,2 ccm sekundäres Natriumphosphat, vgl. *L. Michaelis*, Praktikum der physikalischen Chemie, 2. Aufl. Berlin 1922, S. 31.

Tabelle III. God.

Datum	In 30 Minuten gesammelter Speichel ccm	Entnommene Speichelmenge ccm	Maltose in %						
			5'	10'	15'	20'	30'	40'	55'
		Ohne Paste							
7. II.	—	½	10	30	45	53	66	69	71
10. II.	—	½	9	13	17	22	30	38	47
		Inaktive Paste							
23. II.	36	½	6	20	28	38	54	65	76
24. II.	33	½	5	16	20	29	43	54	67
		Paste mit 50 Macheinheiten							
27. II.	35½	½	4	11	16	20	29	38	50
28. II.	33	½	4	11	18	25	34	44	57
8. III.	37½	½	7	20	34	42	57	67	63
14. III.	22½	½	11	22	28	38	52	60	66

Toluol und sorgten dafür, daß die Stärkelösung die Temperatur von 37° angenommen hatte, bei der sie nachher gehalten wurde, ehe wir den Speichel zusetzten. Bei der Probeentnahme ließen wir 10 ccm der vereinigten Lösungen in 5 ccm 5proz. Sodalösung einfließen, wodurch die amylolytische Wirkung des Speichels angehalten wird. Nachher

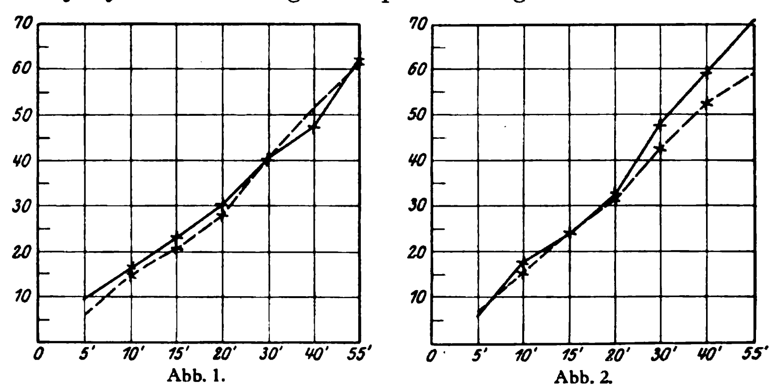


Abb. 1. Abb. 2.

konnten wir unsere Zuckertitrationen in Ruhe ausführen; gelegentlich haben wir uns durch Doppelversuche von der Richtigkeit der gefundenen Kupferwerte überzeugt, die nach der Tabelle von *Bertrand* auf Prozent Maltose umgerechnet wurden.

Das Endergebnis unserer Versuche und den Vergleich zwischen dem normalen und dem nach Behandlung mit aktiven Mitteln gewonnenen Speichel haben wir in vorstehenden Durchschnittskurven (Abb. 1 und 2) zusammengefaßt, die das arithmetische Mittel aller Versuche der zwei Versuchspersonen enthalten.

Physikalisch-chemische Untersuchungen an Körperflüssigkeiten.

VII. Mitteilung.

Die Umwandlung von Albumin in Globulin.

Von

Stefan Rusznyák.

(Aus der III. medizinischen Klinik der Universität in Budapest.)

(Eingegangen am 5. Juni 1923.)

Die Tatsache, daß Serumalbumin sich in Globulin umwandeln kann, ist seit den schönen Untersuchungen von *Moll* (1) keine Neuigkeit mehr. Daß die Wichtigkeit dieser Beobachtung in der Literatur nicht genügend betont wurde und die Untersuchungen *Molls* nicht weitergeführt worden sind, hat ihre Ursache in erster Linie in der Schwerfälligkeit der Methodik. Die bisher geübte Gravimetrie ist für Reihenuntersuchungen ungeeignet. Ich habe vor einiger Zeit eine nephelometrische Methode mitgeteilt (2), mittels welcher die Bestimmung des Albumin-Globulinquotienten rasch, einfach und in kleinen Substanzmengen möglich ist. Mit dieser Methode habe ich die Befunde von *Moll* nachgeprüft und die Umwandlung von Albumin in Globulin auch unter anderen Bedingungen untersucht. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sollen hier kurz mitgeteilt werden.

Die Wärmewirkung.

Moll gibt an, daß bei der halbstündigen Erwärmung des Serums auf 56° C ein Teil des Albumins sich in Globulin verwandelt. Bei höheren Temperaturen soll sich außer Globulin auch Alkalialbuminat bilden. Die Unterscheidung dieser Substanzen erfolgt bloß auf Grund ihrer verschiedenen Löslichkeit in verdünnten Salzlösungen. Ich bin jedoch mit *Hofmeister* der Ansicht, daß die Löslichkeit allein nicht zur Unterscheidung der beiden Eiweißkörper genügt, da bekanntlich das Globulin selbst sehr leicht sich in eine unlösliche Modifikation verwandelt.

Die Befunde *Molls* konnte ich mit eigener Methode bestätigen. Es ergab sich hierbei die interessante Tatsache, daß Sera verschiedener Herkunft verschieden hitzempfindlich sind, und zwar besteht anscheinend

ein Zusammenhang zwischen der Koagulationstemperatur des Serums und der globulinbildenden Wirkung der Erhitzung; je niedriger die Koagulationstemperatur, desto größer die Globulinvermehrung bei 56°C.

Interessant ist auch der Vergleich der Wirkung von verschiedenen Temperaturen. Zur Illustration sollen folgende zwei Versuche mitgeteilt werden. Die beiden Sera wurden 4 Stunden lang im Wasserbade bei der angegebenen Temperatur gehalten, dann auf 20° C abgekühlt und untersucht.

Temperatur °C	Albumin-Globulinquotient Serum I	Serum II
20	1,80	3,16
38	1,94	—
42	2,00	3,64
56	1,66	2,12
59	1,56	koaguliert

Aus der Tabelle ist zunächst die erwähnte Tatsache ersichtlich, daß die Vermehrung des Globulins (= Kleinerwerden des Quotienten) bei 56°C bei dem leichter koagulierenden Serum II bedeutend größer ist als bei dem schwer erstarrenden Serum I.

Sehr bemerkenswert ist die bei 42°C erfolgende Vermehrung des Albumins auf Kosten des Globulins (= Größerwerden des Quotienten). Dieser Befund bestätigt in wirksamer Weise die Meinung von *Fåhrens* (3), *Höber* und *Mond* (4) und *Kanai* (5), welche der Ansicht sind, daß die Herabsetzung der Sedimentierungsgeschwindigkeit des Blutes durch Erwärmung auf 42° C eben durch die Verringerung der Globuline verursacht wird.

Das bei 56° C entstandene Globulin ist irreversibel, d. h. es läßt sich weder durch Abkühlung noch durch Säuren, Laugen usw. wieder in Albumin verwandeln.

Die Säurewirkung.

Wenn man unter Globulinen vorläufig die bei Halbsättigung mit Ammonsulfat ausfallende Fraktion des Serums versteht, so läßt es sich leicht zeigen, daß die Menge dieser Fraktion durch Hinzufügung von Säure zum Serum bedeutend vermehrt werden kann, und zwar verhalten sich dabei die verschiedenen Säuren sehr verschieden. Folgender Versuch soll das Gesagte illustrieren.

Verwendet wurde das Serum von einem Kranken mit Nephrosklerose, der Albumin-Globulinquotient des ursprünglichen Serums betrug 2,58. Zu je 2 ccm Serum wurde 1 ccm destilliertes Wasser oder 1 ccm einer n/5 Säurelösung zugesetzt, so, daß die Endkonzentration der Säure in jedem Röhrchen n/15 war, natürlich wurde in jedem

Röhrchen ein Teil der Säure durch das Serum neutralisiert. Wenn wir nun den Globulingehalt des mit Wasser verdünnten Serums mit 1,00 bezeichnen, so können wir aus den nephelometrischen Ergebnissen die Vermehrung des Globulins in den einzelnen Röhrchen berechnen.

Zusatz	Relativer Globulingehalt
Wasser	1,00
Salzsäure	1,55
Schwefelsäure	1,85
Essigsäure	1,15
Milchsäure	1,32
Ameisensäure	1,31
Citronensäure	1,09
Oxalsäure	1,31
Brenztraubensäure	1,13

Der Wirksamkeit nach geordnet lassen sich die Säuren auf Grund von mehreren Versuchen in folgende Reihe ordnen:

Schwefelsäure > Salpetersäure > Salzsäure > Oxalsäure > Milchsäure > Ameisensäure > Essigsäure > Brenztraubensäure > Citronensäure.

Ob die globulinvermehrende Wirkung der Säuren nur die Funktion der $H^{\cdot}$-Konzentration ist oder ob dabei auch das Säureanion eine Rolle spielt, müssen weitere Versuche zeigen. Die Globulinvermehrung kann bei hohen Säurekonzentrationen (z. B. bei n/10 HCl-Gehalt) so groß sein, daß in der Lösung überhaupt kein Albumin mehr nachweisbar ist.

Die globulinbildende Tätigkeit der Säuren ist reversibel. Wenn man dem Serum nach Säurezusatz so viel Lauge zufügt, daß die zugesetzte Säure neutralisiert wird, so findet man den ursprünglichen Globulingehalt wieder. Wir können somit zwei Modifikationen des Globulins unterscheiden: eine reversible Form, welche sich in Albumin rückverwandeln läßt und eine irreversible Form, aus welcher kein Albumin mehr gebildet werden kann. Im nativen Serum ist der größte Teil des Globulins in der irreversiblen Modifikation vorhanden, doch besteht daneben ein kleinerer Teil in der reversiblen Modifikation, da, wie wir gesehen haben, durch Erwärmung des Serums auf 42°C ein Teil des Globulins in Albumin übergeht. Ähnliche Verhältnisse finden sich auch bei der Einwirkung von Lauge auf das Serum.

Die Laugenwirkung.

Wenn man dem Serum Lauge in verschiedenen Konzentrationen zufügt und dann den Albumin-Globulinquotienten der Lösung bestimmt, so findet man, daß sich der Quotient in ganz charakteristischer Weise je nach der Laugenkonzentration verändert. Folgende zwei

Beispiele sollen dieses Verhalten illustrieren. Bei beiden Versuchen wurde als Lauge Natronlauge verwendet.

Laugen-konzentration	Albumin : Globulin	Laugen-konzentration	Albumin : Globulin
Serum I		Serum II	
0	1,50	0	2,96
n/80	1,64	n/240	3,18
n/40	1,36	n/120	3,34
n/20	0,88	n/60	3,66
		n/30	3,04

In beiden Versuchen fällt auf, daß bei kleinen Laugenkonzentrationen der Albumin-Globulinquotient zunächst ansteigt, was eine Umwandlung des Globulins in Albumin bedeutet; den kleinsten Globulingehalt finden wir bei Konzentrationen von ungefähr n/80 bis n/60; bei höheren Konzentrationen wächst dagegen allmählich die Menge des Globulins auf Kosten des Albumins derart, daß bei Konzentrationen von etwa n/10 an der ursprüngliche Globulingehalt schon überholt ist.

Die Umwandlung des Albumins in Globulin unter Laugeneinwirkung ist reversibel, d. h. sie geht auf Säurezusatz zurück.

Verschiedenes.

Außer dem bisher Mitgeteilten habe ich noch die Einwirkung von einer ganzen Reihe anderer Substanzen auf das Serum untersucht. Im folgenden sollen nur die wichtigeren Ergebnisse dieser Untersuchungen mitgeteilt werden.

Äthylalkohol verursacht erst in hohen Konzentrationen von 15 bis 20% an eine Vermehrung des Globulins.

Mercurichlorid ist bis auf Konzentrationen von m/160 unwirksam. Der bei größeren Konzentrationen sich bildende Niederschlag entsteht hauptsächlich auf Kosten des Globulins.

Coffein ist zwischen m/6400 und m/80 unwirksam.

Ureum fördert die Globulinbildung aus Albumin, wie das auch *Moll* gefunden hat.

Bromalhydrat und *Chloralhydrat* haben einen starken globulinbildenden Effekt, ebenso *Neosalvarsan.*

Vierstündige Behandlung des Serums mit *Trypsin* (*Grübler*) bei 37°C ist wirkungslos.

Die Wirkung von *Seifen* auf das Serumeiweiß ist nephelometrisch nur schwer zu verfolgen, da die Seifen an sich in der verwendeten halbgesättigten Ammonsulfatlösung eine Trübung verursachen, welche die nephelometrische Globulinbestimmung stört. Der Vollständigkeit halber habe ich die Wirkung von Natriumoleat auf das Serum gravimetrisch untersucht und eine geringe Zunahme des Globulins gefunden.

Wirksam sind fast alle organische *Säuren*. Unwirksam dagegen eine ganze Reihe von organischen Stoffen, wie: Chinin, Vuzin, Papayotin, Cantharidin, Digitonin, Scatol, Indol, Sarkin, Solanin, Albumosen, Leucylglycin, Glykokoll, Edestin, Nuclein, Natr. nucleinic., Natr. asparagin., Vanillin, Phloroglucin, Phenacetin, Acetylphenylhydrazin, Dimethylamidobenzaldehyd, o-Nitrobenzaldehyd, p-Phenylendiamin, Hydroxylamin, Ninhydrin, Natr. nitroprussid., Natr. salicyl., Cholin, Kreatinin, Xanthin, Guanidin carb., Piperazin, Thiocarbamid, Dextrose.

Zusammenfassung.

Der Übergang von Serumalbumin in Globulin und umgekehrt steht in gutem Einklange mit der Auffassung von *Herzfeld* und *Klinger* (6), daß die Haupteiweißfraktionen des Serums keine chemischen Individuen sind, sondern Modifikationen desselben Eiweißkörpers. Die Annahme jedoch, daß diese Modifikationen ihre verschiedene Stabilität gegenüber konzentrierten Salzlösungen ihrem verschiedenen Dispersitätsgrade verdanken, ist durch nichts begründet. Der Dispersitätsgrad ist bei Suspensionskolloiden eine gut definierte meßbare Größe. Bei Emulsionskolloiden dagegen haben wir vorläufig kein Mittel, um etwas über deren Dispersitätsgrad zu erfahren. Wahrscheinlich sind die Eiweißkörper im Serum zu ihrem größten Anteil molekular gelöst (s. auch die Untersuchungen von *J. Loeb*) (7), und es ist vorderhand ganz unberechtigt zu behaupten, daß die leichtere Fällbarkeit der Globuline eine Folge ihres kleineren Dispersitätsgrades sei. Bekanntlich ist die Fällbarkeit der Eiweißkörper am größten in der Nähe ihres isoelektrischen Punktes; wenn wir von diesem Gesichtspunkte aus die Bluteiweißkörper betrachten, so sehen wir, daß bei der gewöhnlich im Plasma herrschenden $H^{\cdot}$-Konzentration das Fibrinogen am nächsten zu seinem isoelektrischen Punkte steht, etwas weiter entfernt sind die Globuline und am weitesten das Albumin. Dies ist dieselbe Reihe, welche auch die Fällbarkeit durch Salzlösungen zeigt. Um zu beweisen, daß die verschiedene Fällbarkeit der Serumeiweißkörper tatsächlich eine Funktion ihres verschiedenen isoelektrischen Punktes ist, muß der Nachweis erbracht werden, daß bei der künstlichen Verwandlung von Albumin in Globulin auch der isoelektrische Punkt des neuentstandenen Eiweißkörpers eine Veränderung erfährt in dem Sinne, daß aus dem ursprünglich für Albumin charakteristischen isoelektrischen Punkt nunmehr ein für natives Globulin charakteristischer isoelektrischer Punkt nachweisbar wird. Ich behalte mir vor, über die diesbezüglich im Gange befindlichen Untersuchungen seinerzeit zu berichten.

Die Ergebnisse der vorliegenden Mittelung sind, daß:

1. Erhitzung auf 42° C und verdünnte Laugen Globulin in Albumin verwandeln können, während

2. höhere Temperaturen, Säuren, konzentriertere Lauge, Alkohol, Ureum, Chloral und Bromalhydrat, Neosalvarsan und wahrscheinlich auch Seifen Albumin in Globulin überführen,

3. daß es eine reversible und eine irreversible Modifikation des Globulins gibt.

Literatur.

1) *Moll*, Hofmeisters Beitr. **4**, 563. — 2) *Rusznyák*, diese Zeitschr. **138**, 370. — 3) *Fåhrens*, zitiert nach *Kanai*. — 4) *Höber* und *Mond*, Klin. Wochenschr. **49**, 2412, 1923. — 5) *Kanai*, Pflügers Arch. **197**, 583. — 6) *Herzfeld* und *Klinger*, diese Zeitschr. **88**. — 7) *J. Loeb*, Proteins and the theory of colloidal behavior. New York 1922.

Beobachtungen über die Wirkung von Acetylcholin, Pilocarpin, Atropin, Kaliumchlorid, Adrenalin, Calciumchlorid und Nicotin auf die Gallenausscheidung am Gallenblasenfistel-Hunde.

Von

Akira Adachi (Nagoya, Japan).

(Aus der experimentell-biologischen Abteilung des pathologischen Instituts der Universität Berlin.)

(Eingegangen am 7. Juni 1923.)

Die Frage der nervösen Beeinflussung der Gallensekretion und der motorischen Funktionen der ableitenden Gallenwege ist noch immer nicht definitiv klargestellt. Die Schwierigkeiten einer solchen Untersuchung liegen nicht zuletzt darin, daß jegliche experimentelle Beeinflussung des Lebernervensystems immer gleichzeitig die Sekretionsnerven und die motorischen Nerven der Gallengang- und Blasenmuskulatur treffen kann.

Selbst dann, wenn man nach der Unterbindung des Choledochus eine Gallenblasenfistel anlegt, oder wenn man nach Unterbindung des Cystikus in den Choledochus eine Kanüle einführt, und dann Nervenreizungen oder -Lähmungen vornimmt, kann immer noch der Gallenabfluß durch motorische Effekte auf die Muskulatur der Ductus hepaticus-Verzweigungen beeinflußt werden, so daß die reinen Sekretionswirkungen nicht zur Anschauung kommen. Die motorischen Wirkungen des Lebernervensystems sind, soweit man sie durch direkte Beobachtung an laparatomierten Tieren oder mittels des Röntgenverfahrens feststellen kann, schon leichter zu analysieren, und es haben die Untersuchungen von *Westphal*[1]), wie die Arbeiten aus dem hiesigen Laboratorium von *Winkelstein*[2]) und *Watanabe*[3]) Klarheit geschaffen. Danach wird die Gallenwegmuskulatur parasympathisch und sympathisch innerviert, worauf auch schon die anatomischen Beobachtungen von *Müller* und *Greving*[4]) hinwiesen. Der Parasympathicus erteilt

---

[1]) *Westphal*, Verhandl. d. Kongr. f. inner. Med. 1922.

[2]) *Winkelstein*, Zeitschr. f. d. ges. exper. Med. **36**, 1923.

[3]) *Watanabe*, nach dem Manuskript zitiert. Deutsch. med. Wochenschrift 1923.

[4]) *Müller* und *Greving*, Verhandl. d. Kongr. f. inner. Med. 1922.

den Gängen, der Blase und dem größten Teil des *Oddi*schen Muskels erregende, der Sympathicus aber hemmende Einflüsse. Nur ein kleiner, um die Choledochusmündung oberflächlich an der Papilla Vateri gelagerter Ringmuskel wird nach *Westphal*[1]) bei schwacher Vagusreizung dilatiert. Bei starker Vagusreizung aber wird die Dilatation dieses Muskels für den Austritt der Galle ins Duodenum bedeutungslos, weil hier der ganze übrige *Oddi*sche Muskel und auch seine in der Papilla Vateri liegenden Bündel sich so krampfhaft kontrahieren, daß dadurch die Papille als blasser anämischer Wulst aus der übrigen Schleimhaut hervorspringt (*Watanabe*). Die Gallenblase zeigt auch bei starker parasympathischer Reizung keine peristaltischeKontraktion, sondern nur eine Tonussteigerung ihrer Wand, während Sympathicusreizung das umgekehrte Phänomen hervorruft. Überhaupt sind peristaltische Kontraktionen an den Gallenwegen in der Norm nicht festzustellen und treten auch bei direkter Nervenreizung nicht auf. Es verläuft das ganze Bewegungsspiel an den Gallenwegen im wesentlichen so ab, daß deren Wand einen höheren oder niedrigeren Tonus annimmt und so den Inhalt der Gänge unter größeren oder geringeren Druck bringt. Diese Hypertonie kann aber bei genügender Reizung auch zum Verschluß führen, wie wir das an der Papille sehen.

In sehr viel geringerem Maße als die Muskulatur der Gallenwege, einschließlich der Blase, untersteht die sekretorische Leberfunktion offenbar nervösen Einflüssen des extrahepatischen Nervensystems. Die hämatogene Reizung durch Sekretinstoffe bekannter oder unbekannter chemischer Konstitution und verschiedener Provenienz hat im Mechanismus der Gallensekretion, soweit er intrahepatisch liegt, eine so große Wirkung, daß ihr gegenüber offenbar die Wirkung des extrahepatischen Nervensystems verblaßt. Zweifellos steht die Gallensekretion nicht unter der straffen Zucht des parasympathischen und des Grenzstrangsystems, wie wir das z. B. von den Speicheldrüsen, den Fundusdrüsen des Magens und dem Pankreas her kennen. So erklären sich zum Teil auch die Schwierigkeiten, denen man bei dem Bemühen begegnet, den Einfluß nervöser Wirkungen auf die Gallensekretion zu studieren.

Dazu kommt dann schließlich noch die Tatsache, daß die faktischen Beobachtungen, die verschiedene Forscher über den Einfluß von Nervenreizungen auf den Gallenaustritt aus Choledochusfisteln oder Gallenblasenkanülen (im letzteren Falle ist der Choledochus natürlich unterbunden) verzeichnen, vielfach divergieren. Es war daher wünschenswert, vor allem noch einmal neues Material an Gallenblasenfistelhunden mit unterbundenem Choledochus über die Gestaltung des

[1]) l. c.

Gallenabflusses aus der Blasenfistel unter dem Eindruck verschiedener chemischer Reizungen oder Lähmungen des Parasympathicus und des Sympathicus zu sammeln. Wenn auch bei dieser Versuchsanordnung, wie ich oben schon ausführte, motorische Effekte immerhin noch intervenieren können, so läßt diese Versuchsanordnung doch jedenfalls eher Rückschlüsse auf Sekretionswirkungen zu als die Beobachtung an Choledochusfisteltieren, bei denen der ganze nervös-muskuläre Mechanismus an der Papille in Funktion bleibt (*Pawlow*sche Methodik). Die Versuche an Gallenblasenfisteltieren, wie ich sie machte, können nur verglichen werden mit Choledochusfistelversuchstieren, bei denen durch die Einführung einer Kanüle die Funktion des *Oddi*schen Muskels ausgeschaltet ist.

Was mich weiter bestimmte, diese Untersuchung aufzunehmen, war der Umstand, daß das stärkste chemische Reizmittel für den Parasympathicus, das wir kennen, nämlich das Acethylcholin bisher überhaupt noch nicht in diesem Zusammenhang verwandt worden war. Ferner lagen auch noch keine Beobachtungen zu der Frage vor, wie durch Kalium und Calcium, von denen das erstere zu den Endorganen des Parasympathicus, das letztere zu denen des Sympathicus nahe Beziehungen hat, der Gallenabfluß durch die Blasenfistel verändert wird.

Ich werde nun zunächst über die Ergebnisse meiner Experimente berichten, um dann zu untersuchen, wie weit meine Beobachtungen mit denjenigen anderer Autoren im Einklang stehen.

Meine Versuchsanordnung war derart, daß die Blasenfistelhunde etwa 12 Stunden nach der letzten Fütterung, die täglich aus 500 g frischem Pferdefleisch, 80 g Reis, 20 g Fett und 100 bis 200 ccm Wasser bestand, in den Versuch genommen wurden. Zunächst wurde von 10 zu 10 Minuten die aus der Kanüle fließende Galle gemessen. Dann wurde das betreffende Medikament intravenös oder subkutan injiziert und nun weiter der Gallenabfluß von 10 zu 10 Minuten beobachtet. Ausnahmsweise wurden auch die Tiere etwa ½ bis 1 Stunde vor oder ebenso lange Zeit nach der Injektion des Arzneimittels gefüttert, um die Einwirkung dieses Mittels auf eine verstärkte Gallensekretion mit verstärktem Gallenabfluß studieren zu können.

I. Parasympathische Mittel.

1. Acetylcholin.

Nach der subkutanen Injektion von 0,2 bis 1,0 ccm einer sterilen 1 proz. Acetylcholinlösung in Wasser trat immer eine sofortige meist völlige Hemmung des Gallenabflusses aus der Kanüle beim nüchternen Tiere auf, von etwa 30 Minuten Dauer. Danach ließ die Hemmung allmählich nach.

2. Pilocarpin.

Nach der subkutanen Injektion von 0,2 bis 1,0 ccm einer sterilen 1 proz. Pilocarpinum hydrochloricum-Lösung trat regelmäßig beim nüchternen Tiere zunächst eine deutliche Verminderung im Gallenabfluß aus der Kanüle auf, die nach etwa 30 Minuten etwas nachließ, um nach etwa weiteren 30 Minuten sich abermals zu verschärfen.

3. Chlorkalium.

Nach der intravenösen Injektion von 10 ccm einer 1 proz. Chlorkaliumlösung trat regelmäßig beim nüchternen Tiere eine Verminderung in dem Gallenabfluß aus der Kanüle auf, die etwa eine Stunde anhielt, um dann allmählich abzuklingen. (An den nächsten Tagen war der Gallenfluß sehr unregelmäßig und öfters war die Färbung der Galle hellgrün.)

4. Atropin.

Nach der subkutanen Injektion von 0,2 bis 1,0 ccm einer 1 proz. sterilen, wässerigen Lösung von Atropinum sulfuricum trat beim nüchternen Tiere nach den kleineren Dosen keine Veränderung, nach den größeren Dosen dagegen eine schwache Verminderung der aus der Blasenfistel abfließenden Gallenmengen auf.

II. Sympathische Mittel.

1. Adrenalin.

Nach der intravenösen Injektion von 0,2 bis 0,5 ccm einer 1 proz. Suprareninlösung trat beim nüchternen Tiere eine rasch vorübergehende Hemmung im Gallenabfluß aus der Kanüle ein.

2. Calciumchlorid.

Nach der intravenösen Injektion von 10 ccm einer 1 proz. bis 20 proz. $CaCl_2$-Lösung trat nach den größeren Dosen eine deutliche, etwa 60 Minuten dauernde Hemmung in dem Gallenabfluß aus der Kanüle auf.

Anhangsweise sei bemerkt, daß die intravenöse Injektion von 10 ccm einer 25 proz. NaCl-Lösung oder einer 5 proz. Na_2SO_4-Lösung keinen Einfluß auf die Gallenabscheidung durch die Fistel hatte, woraus hervorgeht, daß die bei der KCl- und $CaCl_2$-Lösung beobachteten Wirkungen keine allgemeinen Salzwirkungen durch Konzentrationserhöhung des Blutes sein können.

Wenn ich diese Versuchsergebnisse am Hunde mit denjenigen von *Neubauer*[1]) am Kaninchen mit einer Choledochuskanüle nach Abklemmung des Ductus cysticus vergleiche, so finde ich, daß in beiden Fällen der Einfluß des Pilocarpins ein geringer ist; der Unterschied ist nur der, daß *Neubauer* beim Pilocarpin eine Tendenz zur Vermehrung feststellte, während bei mir eine Tendenz zur Verminderung der Gallenmenge sichtbar war.

Bei den Atropinversuchen sah *Neubauer* überhaupt keine Wirkung, ich dagegen eine deutliche Herabsetzung bei großen Dosen. Damit stimmen auch die Beobachtungen von *Alpern*[2]) am Gallenblasenfistelhunde überein.

---

[1]) *Neubauer*, diese Zeitschr. **109**.

[2]) *Alpern*, ebendaselbst **137**.

Bei den Adrelaninversuchen ist die Übereinstimmung mit *Neubauer* eine vollkommene.

Aus den Bestimmungen des spezifischen Gewichts und der Trockensubstanz der verschiedenen Gallenmengen geht aus den *Neubauer*schen Versuchen hervor, daß das spezifische Gewicht erhöht und die Trockensubstanz der Galle vermehrt ist nach der Pilocarpininjektion wie nach der Adrenalininjektion, während die Oberflächenspannung nach der Pilocarpininjektion keine Veränderung und nach der Adrenalininjektion eine Herabsetzung zeigt, wobei die letztere auf einen erhöhten Gehalt der Galle an Gallensäuren hindeutet.

Atropin läßt alle diese Eigenschaften der Galle unverändert.

Nach den *Neubauer*schen Versuchen führt also die Parasympathicusreizung wie auch die Sympathicusreizung zu einer Konzentrationssteigerung der Galle, wobei dieselbe speziell nach der Sympathicusreizung auf Gallensäuren beruht.

Die Abscheidung einer dünnflüssigen Galle aber hat weder *Neubauer* noch ich nach den Reizungsversuchen gesehen. Somit scheint die Wasserabscheidung durch die Leber so gut wie ganz dem Nerveneinfluß entrückt zu sein. Nerveneinfluß ruft allemal die Absonderung einer dickflüssigen Galle hervor, wenn er überhaupt einen exsitosekretorischen Effekt hat. Wenn sich nun zu einem solchen exsitosekretorischen Einfluß noch Erschwerungen im Abfluß der Galle, sei es durch Spasmus oder durch Lähmung der Gallenwege (Acetylcholin- bzw. Atropinwirkung) hinzugesellen, muß es in jedem Falle zu einer Verminderung in dem Abfluß der Galle kommen. Denn auch die nach Parasympathicusreizung von *Neubauer* beobachtete Vermehrung der Gallenmenge ist so minimal, daß sie die in der Konzentrationserhöhung und im Spasmus der Gallenwege liegende Abflußerschwerung nie und nimmer wettmachen kann.

Wenn ich nun durch große Nicotingaben (1 ccm einer 1proz. Nicotinlösung subkutan injiziert) das sympathische und parasympathische Nervensystem auf die Leber beeinflußte, vielleicht ausschaltete, so trat alsbald eine vollständige Hemmung im Gallenabfluß aus der Blasenkanüle auf, was nach dem soeben Gesagten verständlich ist. Kleinere Nicotindosen rufen dagegen zunächst eine Vermehrung und nach etwa 30 Minuten eine leichte Verminderung des Gallenabflusses hervor.

Zum Schlusse will ich noch bemerken, daß dann, wenn durch eine reichliche Fütterung mit Nahrung die Gallensekretion und der Gallenabfluß lebhaft in Gang gebracht wird, alle diese Medikamente nur einen weit geringeren Einfluß auf den Verlauf der Gallenabsonderung durch die Fistel haben, ohne daß der Einfluß im Prinzip etwa geändert würde.

Aus allen meinen Versuchen und den in der Literatur vorliegenden Beobachtungen ergeben sich also folgende Tatsachen:

1. Das parasympathische und sympathische Nervensystem hat einen sehr starken Einfluß auf die motorische Funktion der Gallenwege und Gallenblase, vor allem im Sinne einer Tonussteigerung (Parasympathicus) und Tonusherabsetzung (Sympathicus).

2. Reizung des parasympathischen Nervensystems durch Acetylcholin, Pilocarpin, Kalium und des sympathischen Nervensystems durch Adrenalin, Calcium bewirkt niemals die Absonderung größerer Mengen dünnflüssiger Galle, wie man sie nach der Nahrungsaufnahme sieht, woraus sich ergibt, daß für die Absonderung einer solchen Galle und besonders für die Abscheidung des Wassers in der Galle Sekretine verantwortlich gemacht werden müssen, die entweder ad hoc vom Körper gebildet, z. B. Histamin (*Alpern*), oder mit der Nahrung ihm zugeführt wurden. Ob der Angriffspunkt dieser Sekretine die Leberzellen selbst oder das intrahepatische Nervensystem ist, kann nicht gesagt werden.

3. Lähmung des parasympathischen Nervensystems durch Atropin verzögert den Gallenabfluß ebenso wie eine starke Reizung dieses Nervensystems oder Reizung des sympathischen Nervensystems. Die Gründe für diese Verzögerung sind offenbar bei den drei Versuchsanordnungen verschieden. Die starke Reizung des Parasympathicus führt wahrscheinlich zu einem spastischen Verschluß der Gallenwege, so daß trotz der Vermehrung gewisser fester Stoffe in der Galle doch keine Vermehrung in den abfließenden Gallenmengen, sondern im Gegenteil eine Verminderung dieser, ja eine völlige Hemmung in der Entleerung zustande kommt, während bei schwacher Reizung infolge der leichten Hypertonie entweder die abfließenden Gallenmengen keine Veränderung oder eine vorübergehende Vermehrung erkennen lassen, von der es aber auch zweifelhaft ist, ob sie überhaupt oder allein in einer Sekretionswirkung ihren Grund hat. Die Lähmung des Parasympathicus führt zu einer Verminderung des Gallenabflusses wohl weniger infolge einer Sekretionslähmung, da die Reizung des Parasympathicus einen so geringen sekretorischen Effekt, auf die Wasserabscheidung fast gar keinen praktisch in Frage kommenden Einfluß erkennen läßt, als vielmehr infolge der Erweiterung der Gallenwege und der damit verbundenen Vergrößerung ihres Fassungsvermögens für Galle. Die Reizung des Sympathicus endlich führt ebenfalls zu einer Erweiterung der Gallenwege und muß schon aus diesem Grunde eine Verminderung der aus der Fistel abfließenden Gallenmengen bewirken; dazu scheint sich außerdem eine geringfügige Verminderung in den zur Abscheidung kommenden Gallenmengen einzustellen, wobei diese Gallenmengen aber eine erhöhte Konzentration an Gallensäuren erkennen lassen.

Protokolle.

1. Hund . . . 14 kg, Weibchen
2. „ . . . 14 kg, Männchen
3. „ . . . 15 kg, Weibchen
4. „ . . . 15 kg, Männchen.

1. Acetylcholinversuche.

Zeit	Gallenmenge ccm
	A. 1. Hund.
10h 35′	1,1
40	1,0
45	1,6
50	1,5
55	1,5
11 00	1,4
5	1,6
10	1,4
15	1,3
20	1,3
25	1,5
30	1,5
11 30	subkutane Injektion v. 0,01 g Acetylcholin
11 35	1,2
40	0,8
45	0,4
50	0,1
55	1 Tropfen
12 00	1 „
5	0
10	1,6
15	1,8
20	1,3
25	1,6
30	2,2
35	2,2
40	1,8
45	1,6
50	1,6
55	2,0
	B. 1. Hund.
12 35	2,2
40	1,8
45	1,6
50	2,0
55	1,6
1 00	1,6
5	1,5
10	1,5
1 10	subkutane Injektion 0,003 g Acetylcholin
1 15	0,8
20	1,0
25	1,0
1h 30′	0,9
35	0,4
40	0,6
45	1,4
50	1,3
55	1,1
2 00	1,7
5	2,2
10	2,0
15	1,8
20	1,7
25	1,7
30	0,7
35	1,6
40	1,7
	C. 1. Hund.
12 35	3,5
40	2,0
45	1,6
50	1,4
55	1,0
1 00	1,1
5	1,1
10	0,8
15	0,9
20	1,2
25	1,0
1 25	subkutane Injektion von 0,002 g Acetylcholin
1 30	0,4
35	0,2
40	0,1
45	0,7
50	1,1
55	0,4
2 00	0,2
5	0,7
10	0,5
15	0,7
20	0,8
25	0,5
30	0,7
35	0,8
40	0,7

Zeit	Gallenmenge ccm
	D. 1. Hund.
11h 50′	0
12 00	0,8
10	5,6
20	5,4
30	3,0
40	2,0
50	2,0
1 00	1,5
10	1,5
20	2,7
1 20	subkutane Injektion von 0,005 g Acetylcholin
1 30	2,4
40	0,5
50	2,1
2 00	2,7
10	1,2
20	0,9
30	0
40	0,1
50	0
3 00	0,1
10	0
20	1,0
30	1,2
	E. 2. Hund.
12 40	1,5
50	1,5
1 00	1,4
10	1,5
20	1,2
30	0,8
40	1,0
50	0,7
2 00	1,4
2 00	subkutane Injektion von 0,01 g Acetylcholin
2 10	0,2
20	0,5
30	2,0
40	1,4
50	1,5
3 00	1,5
	Hund ist sehr unruhig
	F. 4. Hund.
1 00	2,4
10	2,6
20	2,6
30	2,8
40	2,4
1h 40′	subkutane Injektion von 0,005 g Acethylcholin u. Gabe von 100 g Frischfleisch
1h 50′	2,4
2 00	3,0
10	2,0
20	2,0
30	2,0
40	2,0
50	2,2
3 00	2,2
10	2,2
20	2,3
30	2,3
	G. 4. Hund.
11 40	2,0
50	2,2
12 00	2,5
10	2,4
20	2,6
30	2,6
40	2,7
12 40	Gabe von 400 g Frischfleisch
50	3,0
1 00	3,2
1 00	subkutane Injektion von 0,005 g Acetylcholin
1 10	3,0
20	2,0
30	2,6
40	2,0
50	2,0
2 00	2,1
	H. 1. Hund.
11 10	0
20	0
11 20	Gabe v. ½ Pfd. Frischfleisch
11 30	1,0
40	4,4
50	5,4
12 00	3,0
10	2,0
20	3,0
30	3,2
40	3,0
50	3,0
1 00	3,0
1 00	subkutane Injektion von 0,01 g Acetylcholin
1 10	4,0
20	2,0

Zeit	Gallenmenge ccm
1h 30′	2,0
40	1,6
50	1,6
2 00	4,0
10	3,2
20	1,4
30	3,4
40	3,0

I. 1. Hund.

Zeit	Gallenmenge ccm
11 10	1,1
20	0
30	0
40	0
50	0
11 50	Gabe von 100 g Frischfleisch
12 00	4,0
10	6,0
12h 20′	4,0
30	3,2
40	3,0
50	3,0
1 00	3,2
1 00	subkutane Injektion von 0,01 g Acetylcholin
1 10	4,8
20	1,4
30	3,0
40	1,8
50	3,2
2 00	1,2
10	2,0
20	3,0
30	3,1
40	2,0

2. Pilocarpinversuche.

A. 1. Hund.

Zeit	Gallenmenge ccm	
1h 15′	1,5	
20	1,2	
25	1,2	
30	1,3	
35	1,3	
40	1,4	
45	1,3	
50	1,2	
55	1,2	
2 00	1,1	
5	1,1	
10	1,0	
2 10	subkutane Injektion von 0,002 g Pilocarpin. hydr.	
2 15	2 Tropfen	speichelt etwas
20	0 „	speichelt mehr
25	1,2	
30	3,0	
35	2,0	ruhig
40	2,2	
45	2,0	
50	1,6	
55	1,3	speichelt wenig
3 00	1,3	
5	1,1	
10	1,1	

B. 1. Hund.

Zeit	Gallenmenge ccm	
11 50	1,6	
55	1,2	
12 00	1,0	
5	2,0	
10	1,1	
12h 15′	1,1	
20	1,0	
25	1,0	
30	1,0	
35	1,0	
40	1,0	
12 40	subkutane Injektion von 0,003 g Pilocarpin. hydr.	
12 45	0,2	
50	0,1	Speichelfluß
55	0,3	
1 00	1,0	
5	1,2	
10	1,4	
15	1,2	
20	1,1	speichelt vermindert
25	1,0	
30	0,1	
35	1,2	
40	0,8	
45	0,5	
50	0,2	speichelt nicht
55	0,7	
2 00	0,2	
5	0,2	
10	0,8	
15	0,8	

Immer ruhig

C. 2. Hund.

Zeit	Gallenmenge ccm
11 5	2,2
15	0,8
25	4,6

Zeit	Gallenmenge ccm	
11h 35'	1,8	
45	1,8	
55	2,0	
12 5	3,0	
12 5	subkutane Injektion von 0,01 g Pilocarpin. hydr.	
12 15	1,0	nach 5 Min. 6 ccm Speichelfluß
25	0,4	
35	1,5	Diarrhöe und Erbrechen
45	0,8	
55	0,4	
1 5	0	
15	0	
25	0	
35	0,2	
45	0	
55	0	
2 5	0	
15	0	
25	0	speichelt nicht
35	0	

D. 2. Hund.

Zeit	Gallenmenge ccm	
3 40	2,0	
50	3,2	
4 00	3,0	
4 00	subkutane Injektion von 0,01 g Pilocarpin hydr.	
4 10	1,6	Speichelfluß
20	0,4	Diarrhöe, Urinieren
30	0	
40	0,1	
50	0	
5 00	0	
10	0	speichelt immer
20	0	
30	0	
40	0	
50	0	
6 00	0	

Nach der Pilocarpininjektion kommt etwas dicke Galle heraus.

E. 3. Hund.

Zeit	Gallenmenge ccm	
11h 5'	1,0	
15	0,5	
25	0,5	
35	1,0	
45	1,0	
55	1,0	
11 55	subkutane Injektion von 0,005 g Pilocarpin	
12 05	1,0	Speichelfluß
15	1,0	
12h 25'	1,0	speichelt nicht
35	1,0	
12 35	subkutane Injektion von 0,01 g Pilocarpin	
12 45	0,8	Speichelfluß
55	1,1	Erbrechen, Urinieren, Diarrhöe
1 5	0,5	
15	0,5	
25	0,7	
35	0,6	speichelt wenig
45	0,8	
55	0,6	
	Nach 2 Stunden	
3 55	6,0	

F. 3. Hund.

Zeit	Gallenmenge ccm	
10 10	2,0	
20	2,0	
30	1,6	
40	1,6	
50	2,0	
11 00	2,0	
11 00	subkutane Injektion von 0,005 g Pilocarpin	
11 10	1,6	Speichelfluß
20	2,2	
30	2,0	
40	1,0	
50	0,5	
12 00	0,5	speichelt immer
10	1,0	
12 10	Gabe von 500 g Fleisch	
12 20	1,5	speichelt wenig
30	2,2	
40	3,0	
50	2,8	
1 00	2,8	
10	3,0	
20	3,4	
30	2,6	

G. 4. Hund.

Zeit	Gallenmenge ccm
10 10	2,4
20	2,3
30	2,2
40	2,2
10 40	Gabe von 400 g Frischfleisch
50	2,4
11 00	2,6
10	3,3
11 10	subkutane Injektion von 0,005 g Pilocarpin

Zeit	Gallenmenge ccm	
11h 20′	2,1	Speichelfluß
30	2,4	Urinieren
40	2,4	
50	1,4	
12h 00′	1,2	
10	1,0	
20	1,8	speichelt nicht mehr
30	2,0	

3. Chlorkaliumversuche.

A. 2. Hund.

11h 00′	3,3
10	4,5
20	4,0
30	5,2
40	2,5
50	2,6

11 50 bis 12h 00′ intravenöse Injektion von 0,1 g Chlorkalium

12 00	1,1
10	2,5
20	5,4
30	1,3
40	1,3
50	4,8
1 00	4,4
10	0,5
20	1,3
30	3,2

Am nächsten Tage ist Gallenfluß sehr unregelmäßig, am übernächsten Tage hat die Galle ganz grüne Farbe und reagiert sauer.

B. 2. Hund.

11h 25′	1,1
35	0,5
45	1,3
55	5,0
12 5	0,8
15	0,3
25	3,3
35	3,3
45	2,5

12 45 intravenöse Injektion v. 0,1 g Chlorkalium

1 5	0
15	0
25	0
1h 35′	3,1
45	8,6
55	2,1
2 5	1,4
15	2,8
25	3,4

Nächste Tage ist Gallenfluß sehr unregelmäßig

C. 2. Hund.

1h 10′	3,5
20	3,6

1 20 intravenöse Injektion von 0,1 g Chlorkalium

1 30	0
40	0,8

1 40 subkutane Injektion v. 0,005 g Pilocarpin

1 50	0
2 00	0
10	0
20	0
30	0
3 30	1,4
40	0,5
50	3,0
4 00	3,0

Nächste Tage ist Gallenfluß sehr unregelmäßig; am übernächsten Tage kommt ganz grüne Galle

11h 10′	2,2
20	1,0
30	0,5
40	0
50	3,0
12 00	4,2
10	0
20	0
30	0,5

4. Atropinversuche.

A. 1. Hund.

10h 15′	3,5
30	3,5
35 } 40 }	
45	4,4
11h 00′	3,8
15	3,5
30	3,2
45	3,8
12 00	2,5

Zeit	Gallenmenge ccm
12h 04 subkutane Injektion v. 0,001 g Atropin. sulfuricum	
12 19	2,6
34	3,8
49	2,6
1 4	2,2
19	1,9
34	1,7
49	1,8
2 4	2,2
19	2,2
34	2,2
B. 1. Hund.	
11 45	1,0
50	1,0
55	0,2
12 00	0,4
5	0,3
10	0,8
15	0,5
20	0,5
25	0,5
30	0,5
12 30 subkutane Injektion v. 0,003 g Atropin. sulfuricum	
12 35	0,4
40	0,6
45	0,6
50	0,4
55	0,6
1 00	0,4
5	0,8
10	0,4
15	0,2
20	0,2
25	0,5
30	0,5
35	0,4
40	0,7
45	0,5
C. 1. Hund.	
12 55	1,4
1 00	0,9
5	0,9
10	1,4
15	1,2
20	1,1
25	1,0
30	1,3
1 30 subkutane Injektion von 0,01 g Atropin. sulfuricum	
1 35	0,6
40	0
1h 45′	0
50	0
55	0
2 00	0
5	0
10	0 Tier sehr unruhig
15	0,6
20	0,6
D. 2. Hund.	
12 25	1,5
35	1,5
45	1,5
55	1,5
1 05	1,5
1 05 subkutane Injektion v. 0,005 g Atropin. sulfuricum	
1 15	1,5
25	1,0
35	0,6
45	0,8
55	0,6
2 05	0,7
Tier sehr unruhig.	
E. 1. Hund.	
10 55	1,0
11 00	0
5	1,1
10	3,0
15	0
20	0
25	0,5
30	0
11 30 Gabe von 1 Pfd. Fleisch	
11 35	1,5
40	0,5
45	1,0
50	0,5
55	0,7
12 00	1,2
5	0,9
10	0
15	0
20	1,7
25	0
30	0
12 30 subkutane Injektion v. 0,003 g Atropin. sulfuricum	
12 35	3,5
40	3,0
45	1,8
50	1,6

Zeit	Gallenmenge ccm
F. 3. Hund.	
10h 10′	2,0
20	2,0
30	2,0
10 30 bis 10h 35′ subkutane Injektion von 0,003 g Atropin. sulfuricum	
10h 35′	0,6
45	2,1
55	1,9
11 5	2,2
11 5 Gabe von 100 g Fleisch	
15	2,0
25	2,0
35	2,0
45	1,8
11 45 Gabe von 400 g Fleisch	
11 55	2,2
12 5	1,7
15	2,0
25	1,8
35	2,1
45	1,8
G. 3. Hund.	
9 15	3,0
25	3,0
35	2,0
45	2,5
55	3,0
10 5	3,0
15	2,5
25	3,0
10 25 v. 1 ccm Digitamin. subkutane Injektion	
10 35	2,5
45	3,0
55	2,8
11 5	3,0
15	3,0
25	2,7
11 25 subkutane Injektion v. 0,03 g Atropin. sulfuricum	
11 35	1,8
45	1,0
55	1,0
12 5	0,9
15	0,75
25	1,8
12 25 Gabe von 500 g Fleisch	
12 35	2,0
45	1,3
55	1,3
1 5	2,0
15	1,6

Zeit	Gallenmenge ccm
H. 3. Hund.	
9h 40′	2,7
50	4,0
10 00	3,5
10	3,0
20	3,0
10 20 subkutane Injektion v. 0,003 g Atropin. sulfuricum	
10 30	3,5
40	4,2
50	3,0
11 00	3,0
11 00 Gabe von 500 g Frischfleisch	
11 10	2,3
20	3,0
30	2,5
40	3,0
50	2,0
12 00	2,0
10	3,5
20	3,0
30	3,0
I. 4. Hund.	
9 20	1,5
30	1,6
40	1,4
50	1,5
10 00	1,5
10 00 intravenöse Injektion v. 5 ccm 10 proz. Atropinlösung	
10 10	2,2
20	2,0
30	2,1
40	1,8
50	1,0
11 00	1,0
11 00 subkutane Injektion v. 0,003 g Atropin. sulfuricum	
11 10	1,4
20	1,1
30	1,0
40	1,0
50	1,1
11 50 Gabe von 500 g Frischfleisch	
12 00	1,0
10	1,8
20	1,4
30	2,0
40	1,5
50	1,4
1 00	1,5

Zeit	Gallenmenge ccm

5. Adrenalinversuche.

A. 1. Hund.

Zeit	Gallenmenge ccm
11h 45′	1,4
50	1,5
55	1,3
12 00	1,1
5	1,0
10	1,0
15	1,0
20	1,0
25	1,0
30	1,0
12 30	intravenöse Injektion von 0,2 ccm 1 prom. Suprarenin hydr.
12 35	0,9
40	0,9
45	1,2
50	1,6
55	1,0
1 00	1,0
5	1,0
10	1,0

B. 1. Hund.

Zeit	Gallenmenge ccm
11 55	1,3
12 00	1,0
5	0,8
10	0,8
15	1,2
20	0,6
25	1,0
30	1,0
35	0,6
40	0,6
45	1,0
50	1,0
55	1,0
12 55	intravenöse Injektion von 0,1 ccm 1 prom. Suprarenin hydr.
1 00	1,0
1 00	intravenöse Injektion von 0,1 ccm 1 prom. Suprarenin. hydr.
1 5	0,8
1 5	intravenöse Injektion von 0,1 ccm 1 prom. Suprarenin hydr.
1 10	0,2
1 10	intravenöse Injektion von 0,1 ccm 1 prom. Suprarenin hydr.
1 15	0,8
1h 15′	intravenöse Injektion von 0,1 ccm 1 prom. Suprarenin hydr.
1 20	0,8
25	0,6
30	0,6
35	0,5
40	0,8
45	0,9
50	1,2
55	1,1
2 00	1,0

C. 2. Hund.

Zeit	Gallenmenge ccm
11 15	0
20	0,2
30	0,8
40	0,8
50	0,5
12 00	0,4
10	1,2
20	3,2
30	3,3
40	3,4
12 40	12h 45′, 12h 50′, 12h 55′ 1h 00, intravenöse Injektion von je 0,1 ccm 1 prom. Suprarenin hydr.
12 45	0,5
50	0,6
55	0
1 00	0,5
5	0
10	0,6
15	0,5
20	0,5
25	0,6
30	1,1
35	0,6
40	0,5
45	0,8
50	0,5
55	0,5
2 00	1,2

D. 3. Hund.

Zeit	Gallenmenge ccm
10 40	0,5
50	0,5
11 00	0,6
10	0,6
20	0,8
30	0,8
40	0,8
50	0,8

Zeit	Gallenmenge ccm
11h 50′	intravenöse Injektion von 0,5 ccm 1 prom. Suprarenin hydr.
12 00	0,8
10	0,8
20	1,0
30	0,7
40	0,7
50	0,6
1 00	0,6
10	0,6
20	0,5
30	0,5
40	0,5
50	0,5
2 00	0,5

E. 2. Hund.

Zeit	Gallenmenge ccm
12 30	1,0
40	0,8
12h 50′	1,0
1 00	1,0
1 00	subkutane Injektion von 0,005 g Atropin. sulfuricum
1 10	1,3
20	1,1
30	0,6
40	0,8
1 40	intravenöse Injektion von 0,5 ccm 1 prom. Suprarenin hydr.
1 50	0
2 00	0,4
10	0,5
20	0,3
30	0,3
40	0,3
50	0,3
3 00	0,3

6. Chlorcalciumversuche.

A. 2. Hund.

Zeit	Gallenmenge ccm
11h 5′	4,0
15	3,5
25	2,0
35	1,6
45	0
55	0
12 5	0
15	5,0
25	5,0
33	3,2
12 25	bis 12h 33′ intravenöse Injektion von 0,1 g Chlorcalcium
12 35	0,6
45	1,6
55	3,8
1 5	4,2
15	5,2
25	3,4
35	3,0
45	3,0
55	3,8

B. 4. Hund.

Zeit	Gallenmenge ccm	
10 40	0,6	
50	1,0	
11 00	1,0	
10	1,0	
20	1,0	
30	1,0	
11 20	bis 11h 30′ intravenöse Injektion von 2,5 g Chlorcalcium	
11 40	1,0	
11h 50′	0,6	
12 00	0,3	
10	0	
20	0,3	
30	1,0	
40	0,6	Galle dick
50	0,6	
1 00	0,6	
10	0,6	
20	0,6	

C. 4. Hund.

Zeit	Gallenmenge ccm
10 25	1,6
35	1,4
45	1,4
55	1,3
11 5	1,4
15	1,2
25	1,3
11 25	bis 11h 40′ intravenöse Injektion von 2,0 g Chlorcalcium
11 40	2,0
50	0,8
12 00	0,3
10	0,6
20	0,6
30	1,0
40	1,2
50	1,6
1 00	1,1
10	1,3
20	0,7
30	1,1

7. Nicotinversuche.

Zeit	Gallenmenge ccm
	A. 1. Hund.
10h 45′	3,0
50	2,0
55	2,0
11 00	1,7
5	1,8
10	1,8
15	1,2
20	1,2
25	1,0
30	1,1.
35	2,5
40	1,8
11 40	subkutane Injektion von 0,002 g Nicotin
11 45	2,8
50	1,8
55	2,6
12 00	1,3
5	1,1
10	1,2
15	1,1
20	1,1
25	1,1
30	1,1
35	1,1
40	1,1
45	0,8
50	0,1
55	0
1 C0	0,2
5	0,4
10	0,2
15	2,0
	B. 1. Hund.
1 30	1,6
35	1,6
40	1,5
45	2,2
50	0,4
55	2,7
2 00	2,0
5	1,3
2 05	subkutane Injektion von 0,003 g Nicotin
2 10	2,4
15	0,6
2h 20′	1,8
25	1,2
30	1,0
35	0,7
40	0,8
45	1,0
50	1,4
55	0,8
3 00	0,2
5	0
10	1,5
15	1,5
20	1,6
25	0,8
30	0,5
35	0
40	1,6
45	1,0
50	0,8
55	0,8
4 00	0,8
	C. 1. Hund.
11 5	1,2
10	1,3
15	1,2
20	1,2
25	0,9
30	1,4
11 30	subkutane Injektion von 0,01 g Nicotin
11 35	1,5
40	1,5
45	0,9
50	0
55	0
12 00	0
5	0
10	0,5
15	1,0
20	2,0
25	2,6
30	2,0
35	0,4
40	0,4
45	1,2
50	1,2
55	1,0
1 00	0,7

8. Acetylcholin und andere Mittel.

A. Atroprin und Acetylcholin.

1. Hund.

Zeit	Gallenmenge ccm
12h 35′	2,0
40	1,4
45	1,6
50	1,6
55	1,8
1 00	1,0
5	1,2
10	1,6
15	1,6
20	1,4
25	1,1
1 25	subkutane Injektion von 0,003 g Atropin. sulfuricum
1 30	3,1
35	1,2
40	1,0
45	1,0
50	1,1
55	1,1
2 00	1,1
2 00	subkutane Injektion von 0,003 g Acetylcholin
2 5	0,8
10	0,6
15	0,2
20	0,7
25	0,7
30	1,0
35	0,7
40	0,2
45	0,7
50	0,7
55	0,8

B. 2. Hund.

Zeit	Gallenmenge ccm
10 55	2,0
11 00	2,2
5	2,4
10	2,0
15	1,0
20	1,0
25	1,0
30	1,0
35	0,8
40	1,0
45	0,8
50	0,5
11h 50′	subkutane Injektion von 0,005 g Atropin. sulfuricum
11 55	1,1
12 00	1,0
5	1,4
10	0,9
15	1,2
20	0,5
25	1,0
12 25	subkutane Injektion von 0,003 g Acetylcholin
12 30	1,0
35	0
40	0
45	0,5
50	0,5
1 00	0,5
5	0,5
10	0,5

C. Acetylcholin und Nicotin.

1. Hund.

Zeit	Gallenmenge ccm
12h 25′	0,5
30	0,3
35	1,6
40	1,8
45	2,1
50	2,1
55	1,8
1 00	1,8
1 00	subkutane Injektion von 0,003 g Nicotin
1 5	2,8
10	1,8
15	2,1
20	1,6
25	1,4
30	1,3
1 30	subkutane Injektion von 0,003 g Acetylcholin
1 35	3,3
40	2,4
45	1,6
50	2,3
55	1,6
2 00	1,2
5	1,2
10	1,3
15	1,3
20	1,4

Zeit	Gallenmenge ccm	Zeit	Gallenmenge ccm
	9. Chlornatriumversuche.		
9h 30′	1,3	11h 30′	1,1
40	1,2	40	1,0
50	1,3	50	1,0
10 00	1,3	12 00	1,1
10	1,3	10	1,1
20	1,1	20	1,0
30	1,3	30	1,0
10 30	intravenöse Injektion von 2,5 g Chlornatrium	12 30	Gabe von 10 g Chlornatrium per os
10 40	1,2	12 40	1,1
50	1,0	50	1,0
11 00	1,1	1 00	1,0
10	1,0		Nach 2 Stunden 8,0 ccm
20	1,1		
	10. Natriumsulfatversuche.		
	3. Hund.	11h 10′	1,0
		20	1,0
9 50	1,6	30	1,4
10 00	1,4	40	1,2
10	1,5	50	1,3
20	1,3	12 00	1,1
30	1,4	10	1,0
40	1,0	20	1,0
50	1,1	30	1,3
11 00	1,1	40	1,1
11 00	intravenöse Injektion von 5 g Natriumsulfat	50	1,2

Über die Methodik der quantitativen Bestimmung des Fibrinogens.

Von

Wilhelm Starlinger.

(Aus der II. medizinischen Klinik in Wien.)

(Eingegangen am 8. Juni 1923.)

Nachdem die Beobachtung des physikalisch-chemischen Zustandes der Eiweißkörper des Blutplasmas in letzter Zeit immer mehr Bedeutung erfährt und mit Hilfe verschiedenster Methodik Ergebnisse gewonnen hat, die in mancher Hinsicht den Grundsätzen der klassischen Eiweißchemie über die Möglichkeit der Trennung des Gesamtproteins in einzelne wohlcharakterisierte Fraktionen nicht mehr völlig zu entsprechen scheinen, dürfte es nicht unangebracht sein, zu untersuchen, ob diese scharfe Abgrenzung, vom rein methodischen Standpunkte aus betrachtet, als berechtigt bzw. durchführbar anzusehen ist.

Soweit diese Fragestellung Globuline und Albumine betrifft, soll hier nur so viel bemerkt sein, daß trotz vielfacher Bearbeitung eine sichere Entscheidung einstweilen noch nicht gegeben werden kann; denn wenn einerseits bei Verarbeitung „gereinigten" Ausgangsmateriales Befunde erhoben wurden, die die Berechtigung einer scharfen Trennung dieser beiden Eiweißkörper erweisen, wie namentlich aus den jüngsten grundlegenden Arbeiten der Schule *Wolfgang Paulis* (1) hervorgeht, so stehen diesen doch wiederum Ergebnisse gegenüber, die beim Studium des Verhaltens „nicht gereinigten" Ausgangsmaterials gewonnen wurden und die mancherlei Übergänge zwischen beiden Fraktionen zur Feststellung gelangen ließen. Da aber nun jedes in dieser Hinsicht zu untersuchende biologische Substrat eine nicht gereinigte Eiweißlösung darstellt und viele Beimengungen, die die bekannten fließenden Übergänge zwischen den einzelnen Fraktionen im Glase bewirken, auch im Organismus ihren Einfluß zur Geltung bringen, so erhebt sich die Frage, ob die Forderung nach ausschließlicher Verwertung von Befunden, die bei Versuchen mit gereinigtem Substrat gewonnen wurden, immer am Platze ist, ob nicht vielmehr auch die andere Untersuchungsrichtung ihre Berechtigung hat, unter Umständen sogar als die wichtigere angesehen werden kann.

Während also das Verhalten der Globuline zu den Albuminen wiederholt der experimentellen Prüfung unterzogen wurde, liegen über die gleiche Fragestellung hinsichtlich des Fibrinogens, wenn man von dem alten Streit über die Stellung des sogenannten Fibrinoglobulins absieht, kaum Untersuchungen vor. Da aber nun gerade der labilsten, gröbstdispersen Eiweißfraktion des Blutplasmas, die wir eben als Fibrinogen bezeichnen, nach mannigfachen Untersuchungen der letzten Jahre beim Ablauf verschiedener physiologisch und pathologisch wichtiger Vorgänge eine bedeutende Rolle zuzukommen scheint und ihr Verhalten daher immer weitere Beachtung gewinnt, soll im folgenden versucht werden, nach vorheriger Prüfung der bisher zur Verfügung stehenden Methodik neue methodische Möglichkeiten auszubauen, deren Gesamtkritik schließlich als Beitrag zur eingangs gegebenen Fragestellung herangezogen werden soll.

Bevor an die Erörterung der verschiedenen Verfahren zur quantitativen Bestimmung des Fibrinogens gegangen werden kann, muß zuerst festgestellt werden, welcher Teil des Gesamteiweißes von vornherein als Fibrinogen anzusehen ist, methodisch also möglichst quantitativ erfaßt werden muß.

Hier stehen sich zwei Auffassungen grundsätzlich gegenüber: die erste faßt unter dem Begriff des Fibrinogens alles Eiweiß zusammen, das bei 28-Vol.-Proz.-Sättigung mit gesättigter Ammonsulfatlösung die Lösung verläßt, sie sieht daher jenen Eiweißkörper, der nach stattgehabter Gerinnung bei der genannten Salzkonzentration noch ausfällt, das sogenannte Fibrinoglobulin, entweder als ein nicht in Fibrin umgewandeltes Fibrinogen oder als ein bei der Fibrinogengerinnung entstandenes Spaltprodukt des Fibrinogens an. Die zweite Anschauung versteht unter Fibrinogen die Gesamtheit des Plasmaeiweißes, die sich im Gerinnungsprozeß in Fibrin umwandelt, sie betrachtet das Fibrinoglobulin als selbständige Fraktion, die mit dem Fibrinogen nur gleiche obere Fällungsgrenzen gemeinsam hat. Entsprechend der jeweiligen Stellungnahme erfolgt dann die Wahl der Methodik entweder im Sinne ellektiver Ammonsulfatfällung oder im Sinne der Überführung des Fibrinogens in Fibrin auf dem Wege spontan erfolgender oder künstlich bewirkter Gerinnung.

Ohne nun auf die Frage nach der Entstehung und Art des Fibrinoglobulins hier eingehen zu wollen, scheint es einerseits folgerichtig, als Fibrinogen nur die Muttersubstanz des Fibrins anzusehen, wofür ja auch seit den Arbeiten *Hekmas* (2), denen zufolge das Fibrinogen als Sol des Fibrins aufzufassen ist, die exakte Grundlage geschaffen ist, andererseits zweckmäßig, als entscheidendes Kriterium die vornehmste und am besten zur Abgrenzung verwendbare Eigenschaft: das Gerinnungsvermögen anzunehmen.

Was nun die angewandte methodische Technik betrifft, so lassen sich die bis jetzt bekannten Verfahren in drei Gruppen einordnen: Die erste bedient sich der Gravimetrie, die zweite zieht das Verfahren

von *Kjeldahl* heran und umfaßt zwei Untergruppen, je nachdem sie die direkte Bestimmung des ausgefällten Fibrinogens oder das Differenzverfahren zwischen Plasma- und Serumeiweiß zur Durchführung bringt, die dritte schließlich macht sich die Ermittlung des Brechungsvermögens ebenfalls im Differenzverfahren zunutze.

In die erste Gruppe fallen die Methoden von *Reye* (3), *Gram* (4), *Foster-Whipple* (5), *Lester* (6), in die zweite Gruppe die Methoden von *Pfeiffer-Kossler* (7), *Porges-Spiro* (8), *Cullen-van Slyke* (9), *Fåhraeus* (10), *Howe* (11), in die dritte Gruppe die Methoden von *Winternitz* (12), *Leendertz-Gromelski* (13), *Leendertz* (14).

Da die genaue Kenntnis der einzelnen Methoden des kritischen Vergleichs wegen notwendig ist, dürfte es sich als zweckmäßig erweisen, sie vorerst in möglichster Kürze wiederzugeben:

1. *Methodik nach Reye.* Blut wird in NaF-Lösung (Endkonzentration etwa 0,6 %) aufgefangen, Plasma durch Zentrifugieren gewonnen, 12 Teile Plasma durch Zusatz von 30 Teilen Wasser und 16 Teilen gesättigter Ammonsulfatlösung [Größenordnung etwa 10,0 + 25,0 + 13,4 ccm; siehe *Langstein-Mayer* (15), *P. Th. Müller* (16)] gefällt, das geflockte Fibrinogen abfiltriert, umgefällt, mit auf 28 Vol.-Proz. gesättigter Ammonsulfatlösung bis zum Verschwinden der Biuretreaktion gewaschen, luftgetrocknet, bei 80° koaguliert, mit heißem Wasser möglichst salzfrei, dann mit Alkohol und Äther unter gleichzeitiger Wasserentziehung möglichst lipoidfrei gewaschen, bei 110° bis zur Gewichtskonstanz getrocknet, gewogen, verascht und zurückgewogen

2. Nach *Gram.* 4,5 ccm Blut werden in einem in $^1/_{10}$ ccm eingeteilten Zentrifugierröhrchen in 0,5 ccm 3 proz. Natrium citricum-Lösung aufgefangen, darauf 90 Minuten lang mit 3000 Touren zentrifugiert und das Volumen der Blutkörperchen abgelesen. 2,0 ccm Plasma werden mit 9 ccm 0,9 proz. Natriumchloridlösung und 2,0 ccm 1 proz. $CaCl_2$-Lösung versetzt und daraufhin 1½ Stunden im Thermostat gehalten; das Gerinnsel wird zwischen Filterpapier abgepreßt, 15 Minuten in destilliertem Wasser, 5 Minuten in absolutem Alkohol, 5 Minuten in Äther gewaschen und nach zweistündigem Thermostataufenthalt auf der Torsionswage gewogen. Der Fibrinogenwert ergibt sich aus der Formel $\frac{(Cb - P) \,.\, W \,.\, 100}{(Cb - C - P) \,.\, 2}$, wobei W das Fibrinogengewicht, Cb die Blutmenge, C die Zitratmenge und P die Blutkörperchenmenge bedeutet.

3. Nach *Foster-Whipple.* 9,0 ccm Blut werden mit 1,0 ccm 1 proz. Natriumoxalatlösung vermischt und im Hämatokrit 30 Minuten bei 3000 Touren zentrifugiert, die Blutkörperchenmenge in $^1/_{10}$ ccm abgelesen, 2 ccm Plasma mit 40 ccm 0,8 proz. NaCl-Lösung und 2 ccm 2,5 proz. $CaCl_2$-Lösung versetzt und 2 Stunden bei Zimmertemperatur stehengelassen; das Gerinnsel wird abgepreßt, in destilliertem Wasser gewaschen, im Porzellantiegel 3 bis 10 Stunden bei 110° zur Gewichtskonstanz getrocknet, gewogen, 15 Minuten über der Bunsenflamme verascht, zurückgewogen. Die Gewichtsdifferenz entspricht unter Berücksichtigung der Blut- und Plasmaverdünnung dem Fibrinogen.

4. Nach *Lester*. 2,0 ccm Oxalatplasma werden in einer großen Menge $CaCl_2$-haltiger NaCl-Lösung koaguliert, das Gerinnsel getrocknet, gewogen, verascht und zurückgewogen.

5. Nach *Pfeiffer-Kossler*. 5,0 ccm 4 proz. Natriumoxalatlösung werden mit Blut auf 100 ccm aufgefüllt, nach Gewinnung des Plasmas 20,0 ccm mit 5,0 ccm 2 proz. $CaCl_2$-Lösung versetzt, mittels des Kjeldahlverfahrens der N-Gehalt bestimmt und die Differenz zwischen diesem und dem N einer äquivalenten Menge nach erfolgter Ca-Gerinnung erhaltenen Serums unter Berücksichtigung der Verdünnung als Fibrinogenstickstoff in Rechnung gesetzt. Dieser ergibt sich aus der Formel: $N_f = \frac{v}{v - v_1} \left(N_p - N_s \frac{p+K}{p}\right)$, wobei N_f den Fibrinogen N, N_p den N des Oxalatplasmas, N_s den des Oxalatserums, p die zur Gerinnung gebrachte Plasmamenge, K die Menge der zugesetzten $CaCl_2$-Lösung, v das nach *Bleibtreu* ermittelte Volum des Oxalatplasmas im Verhältnis zum Gesamtblut und v_1 die in 1000 ccm Oxalatplasma enthaltene Menge Oxalatlösung bedeuten.

6. Nach *Porges-Spiro*. Bestimmung der *Kjeldahl*-N-Differenz zwischen Plasma und Serum im Makroverfahren.

7. Nach *Cullen-van Slyke*. 5,0 ccm Plasma (aus Blutoxalatlösunggemisch mit etwa 0,3% Salz-Konzentration gewonnen) werden mit 100 bis 150 ccm 0,8 proz. NaCl-Lösung und 5,0 ccm 2,5 proz. $CaCl_2$-Lösung versetzt, das nach erfolgter Gerinnung gewonnene Gerinnsel fünfmal mit 0,8 proz. NaCl-Lösung gewaschen und sein N nach *Kjeldahl* bestimmt.

8. Nach *Fåhraeus*. Etwa 50 mg Blut werden in dünnem Papier aufgesaugt, gewogen und nach einigen Minuten mit 8 bis 10 ccm äußerst verdünnter Lauge in der Kälte extrahiert, wobei alle Blutbestandteile außer dem geronnenen Fibrinogen in Lösung gehen. Wenn das Papier farblos geworden ist, wird die Lösung abgegossen und mit Wasser nachgefüllt. Das Fibrin wird entweder durch Verbrennen des ganzen Papiers oder eines mit 8 bis 10 ccm n/100 NaOH bei 30 bis 40° erhaltenen Extraktes nach *Bang* bestimmt.

9. Nach *Howe*. 0,5 ccm Salzplasma werden bei Zimmertemperatur mit 14 ccm 0,8 proz. NaCl-Lösung und 1 ccm 2,5 proz. $CaCl_2$-Lösung unter Zufügung eines Thymolkristalles versetzt und der N-Gehalt vor und nach erfolgter Gerinnung ermittelt.

10. Nach *Winternitz*. Mittels des *Pulfrich*schen Eintauchrefraktometers wird das Brechungsvermögen von Hirudinplasma und dazu gehörigem Serum bestimmt und die Differenz nach Umrechnung in Eiweißwerte auf Grund der *Reiss*schen Tabellen als Fibrinogen angenommen.

11. Nach *Leendertz-Gromelski*. Unter Vernachlässigung der ursprünglichen Angabe[1]) als modifiziertes Verfahren[2]): a) Blut wird mit paraffiniertem Instrumentarium entnommen, sofort zentrifugiert, das derart gewonnene Nativplasma mit isotonischer (3,55 proz.) Natrium citricum-Lösung im Verhältnis von etwa 1:15 vermischt und sein Brechungswert = R_1 bestimmt. Nach Spontangerinnung des Nativplasmas Versetzung des so gewonnenen Plasmaserums mit 3,55 proz. Zitratlösung in genau gleichem Verhältnis wie oben, Bestimmung des Brechungswertes = R_2. Fibrinogen = $(R_1 - R_2) \cdot 0{,}215$ (als Mittelwert des Eiweißumrechnungsfaktors entsprechend einem Teilstrich der *Pulfrich*schen Skala). b) Das Blut wird in 3,55 proz.

---

[1]) Arch. f. exper. Pathol. u. Pharm. **94**, 1922.

[2]) Ebendaselbst **96**, 1923.

Natrium citricum-Lösung im Verhältnis 15 : 1 aufgefangen und darauf ein Teil des so gewonnenen Zitratplasmas mit dem 30. Teil einer 1,5 proz. Lösung von $CaCl_2$ versetzt. Auf Grund der vor und nach erfolgter Gerinnung vorgenommenen Bestimmung des Brechungsvermögens ergibt sich der Fibrinogengehalt aus der Formel $(R_1 - R_2) \cdot 0{,}215$. Bei beiden Methoden wird bei Bestimmung von fibrinogenarmem Plasma die Verdünnung infolge des Zusatzes der Salzlösungen als praktisch zu vernachlässigen betrachtet, bei fibrinogenreichem Plasma durch Einführung des Verdünnungsfaktors 16/15 berücksichtigt, entsprechend der Formel $(R_1 - R_2) \cdot 0{,}229$ (= 0,215 . 1,067) für die Methode a) und $(R_1 - R_2) \cdot 0{,}252$ für die Methode b) (bei Berechnung des Verdünnungsfaktors auf Grund der Annahme: Plasma = halbe Blutmenge mit 1,17.

12. Nach *Leendertz*. 5,4 ccm Nativplasma werden mit 0,6 ccm einer 3,6 proz. Na-Zitratlösung versetzt und damit zur genauen Festsetzung der nötigen $CaCl_2$-Menge, die das Optimum der Gerinnungszeit für die Durchführung der refraktometrischen Bestimmung gleich 15 bis 20 Minuten ergibt, eine Reihe von Röhrchen, die von 0,03 bis 0,3 ccm steigende Mengen einer 0,15 proz. $CaCl_2$-Lösung enthalten, mit je 0,5 ccm beschickt. Nach neuerlicher Verstellung der auf diese Weise gefundenen bestgeeigneten Verdünnung mit $CaCl_2$-Lösung Bestimmung von R_1 und R_2 und Berechnung des Fibrinogens durch Multiplikation der Differenz dieser Werte mit 0,215 als Eiweißfaktor und $x/0{,}45$ als Verdünnungsfaktor, wobei unter x die jeweilige Gesamtmenge des Na-Zitrat-$CaCl_2$-Plasmagemisches zu verstehen ist.

Bevor nun an die Kritik der speziellen Methodik gegangen werden soll, mögen vorerst einige Fragen der allgemeinen Methodik, deren grundsätzliche Bedeutung für alle Verfahren gemeinsam gilt, Erörterung und Entscheidung finden: Diese Fragen betreffen erstens die Gewinnung des Plasmas, zweitens, falls Differenzverfahren zur Anwendung gelangen, auch die des Serums.

Zu ersterem Zwecke stehen drei Möglichkeiten zur Verfügung: 1. die Gewinnung von Nativplasma, 2. die Gewinnung von Hirudinplasma, 3. die Gewinnung von Salzplasma.

Ad. 1. Die Verwendung von *Nativplasma*, d. h. von Plasma, das nur durch Benutzung paraffinierten Instrumentariums und durch raschestes Zentrifugieren erhalten wird, würde das an und für sich bestmögliche Ausgangsmaterial für jede physikalisch-chemische Untersuchung zur Verfügung stellen, da in diesem Falle die jeweilige physikalisch-chemische Struktur in keiner Weise als zerstört oder auch nur beeinträchtigt angesehen werden kann, doch hat sie bis jetzt für menschliches Plasma, soweit ich die Literatur übersehen konnte, und zwar wohl in Anbetracht der angeblichen außerordentlichen Schwierigkeit der experimentellen Technik, noch keine Verwertung erfahren. Tatsächlich ist aber die Gewinnung von menschlichem Nativplasma, wenn auch nicht leicht, so doch bei entsprechender Übung durchaus möglich und erlaubt volle experimentelle Verwertung, wenn die Versuchsdauer vom Beginn der Blutentnahme an gerechnet

eine Zeit von längstens 15 bis 20 Minuten nicht überschreitet. Auf die technischen Einzelheiten wird später zurückzukommen sein, hinsichtlich der grundsätzlichen Verwertung für unseren Zweck möge jedoch schon hier bemerkt werden, daß die Verwendung von Nativplasma nur im Rahmen der refraktometrischen, nicht aber der gravimetrischen oder Kjeldahlmethodik erfolgen kann. Denn das in Anbetracht der Notwendigkeit raschen Arbeitens nur kurzmögliche Zentrifugieren vermag zwar die zelligen Elemente des Blutes bis auf Spuren zu beseitigen, nicht aber die Blutplättchen, deren Anwesenheit aber sowohl das mittels der Wage als auch mittels der N-Bestimmung gewonnene Resultat in jeweils nicht zu beurteilendem Ausmaße beeinträchtigt, das Brechungsvermögen des Plasmas aber nicht beeinflußt.

Ad. 2. *Hirudinplasma* wird durch Zusatz von Hirudin in Substanz gewonnen und kann ebenfalls bei Berücksichtigung aller Kautelen nur im refraktometrischen Verfahren völlig einwandfreie Verwertung finden. Denn die Gravimetrie und die Kjeldahlbestimmung im direkten Verfahren liefern in Anbetracht der irreversiblen Stabilisierung eines großen Teiles des Fibrinogens durch das Hirudin trotz erfolgter maximaler Gerinnung viel zu kleine Werte und auch beim Kjeldahlverfahren auf Grund der Differenzbestimmung des Eiweißgehaltes von Hirudinplasma und dazu gehörigem Serum dürfte das zugesetzte Hirudin unter Umständen Fehler, die allerdings praktisch sehr gering veranschlagt werden müssen, verursachen. Auf das Brechungsvermögen des Plasmas aber erstreckt sich, wie ich später zeigen werde, seine Einflußnahme nicht. Im übrigen hat die Verwendung von Hirudin in Anbetracht der völligen Unmöglichkeit seiner Erwerbung zur heutigen Zeit nur theoretische Bedeutung.

Ad. 3. Die einfachste, billigste und daher auch fast ausschließlich geübte Art der *Plasmagewinnung* beruht auf der Verhinderung der Gerinnung durch *Zusatz gewisser Salze*, der 1. entweder zum Vollblut oder zum Nativplasma, 2. in wässeriger Lösung oder in Substanz erfolgen kann.

Wird das Salz in wässeriger Lösung zum Vollblut zugesetzt, so bedingt dies eine nicht geringe Fehlermöglichkeit: Denn da für unsere Zwecke die Notwendigkeit besteht, den Fibrinogengehalt in Grammprozent des Blutplasmas zu berechnen — denn bezogen auf das Gesamtblut würde er in erster Linie vom Blutkörperchenvolumen abhängig sein — so ist es klar, daß entweder keine Verdünnung des Blutplasmas bei seiner Gewinnung erfolgen darf oder daß die Relation Blutkörperchenvolum/Plasmavolum jedesmal bestimmt werden muß. Bei Gewinnung von Nativplasma und Hirudinplasma wird die erste Forderung ohne weiteres erfüllt, bei der Gewinnung von Salzplasma durch Zusatz des Salzes in Lösung zum Vollblut aber wird der Verdünnungsfaktor nur bei gleichzeitiger Blutkörperchenvolumbestimmung bekannt. Von

einer Reihe von Autoren (*Reye, Lester, Porges-Spiro, Cullen-van Slyke, Howe*) werden nun diese Faktoren überhaupt nicht, von anderen (*Leendertz-Gromelski*, Methode b) nicht im vollen Maße berücksichtigt, während *Pfeiffer-Kossler, Gram* und *Foster-Whipple* ihnen zwar voll Rechnung tragen, dafür aber die methodische Erschwerung der jeweiligen Blutkörperchenvolumbestimmung, deren Genauigkeit für unseren Zweck außerdem kaum genügen dürfte, in Kauf nehmen müssen. Erfolgt der Salzzusatz außerdem noch in nicht isotonischer Lösung (*Gram, Foster-Whipple, Pfeiffer-Kossler*), so wird die entstandene Verdünnung noch weiterhin vergrößert durch den Wassereinstrom aus den roten Blutkörperchen in das durch das Salz hypertonisch gemachte Plasma.

Verwendet man aber zur Salzplasmagewinnung wie *Leendertz* Nativplasma, so wird diese Fehlerquelle ausgeschaltet, gleichgültig, ob man den Salzzusatz in Lösung oder Substanz vornimmt; in ersterem Falle ergibt sich lediglich die jeweils bekannte rechnerische Verdünnungskorrektur.

Setzt man schließlich das Salz in Substanz zum Vollblut, so erfolgt natürlich ebenfalls die durch die künstliche Hypertonie des Plasmas bewirkte Verdünnung desselben, doch fehlt die experimentelle Entscheidung, ob diese groß genug ist, um das Resultat der Fibrinogenbestimmung praktisch zu beeinträchtigen: Verwendet man als gerinnungsverhinderndes Salz Natriumzitrat, so genügen im allgemeinen Konzentrationen von weniger als 0,1 % bezogen auf das Gesamtblut, um bei einiger Übung die Gerinnung zu vermeiden. Doch pflege ich für gewöhnlich eine 0,1proz. Konzentration nicht zu unterschreiten und verwende meist, um auch bei den gerinnungsaktivsten Blutproben jede Gerinnung zu umgehen, eine 0,2proz. Konzentration. Vergleicht man nun das Brechungsvermögen eines auf solche Weise gewonnenen Zitratplasmas mit dem des zugehörigen Nativ- oder Hirudinplasmas, so ergibt sich, wie die folgende Tabelle I zeigt, daß ersteres für gewöhnlich dem zweiten nachsteht, manchmal den gleichen Wert ergibt, es selten auch um eine ganz geringe Differenz übertrifft. Die Erklärung liegt darin, daß der Brechungswert des zugesetzten Salzes den des Plasmas an und für sich erhöhen würde, wenn nicht der Wassereinstrom aus den Blukörperchen erfolgte; überwiegt der letztere Einfluß, so gelangt das erste Ergebnis zur Beobachtung, im umgekehrten Falle das zweite, halten sich beide Faktoren die Wage, so ergeben sich gleiche Werte.

Methodik: Blutentnahme durch Punktion der Armvene, Gewinnung von Hirudinplasma (HP) durch Zusatz von Hirudin in Substanz, Gewinnung von Zitratplasma (ZP) durch Zusatz von 0,002 g gepulverten Natriumzitrats zu 1,0 ccm Blut. Die Brechungswerte sind, wie in allen folgenden Tabellen in *Pulfrich*schen Skalenteilen angegeben.

Tabelle I.

HP	ZP	Differenz	HP	ZP	Differenz	HP	ZP	Differenz
59,5	58,7	0,8	60,4	60,1	0,3	61,1	61,0	0,1
61,3	60,7	0,6	60,1	59,8	0,3	57,4	57,4	0,0
64,4	63,8	0,6	60,4	60,1	0,3	54,0	54,0	0,0
58,7	58,1	0,6	59,9	59,6	0,3	57,7	57,7	0,0
63,1	62,5	0,6	55,8	55,5	0,3	61,3	61,3	0,0
62,4	61,9	0,5	63,8	63,6	0,2	48,0	48,0	0,0
46,9	46,4	0,5	57,4	57,2	0,2	49,6	49,7	— 0,1
45,1	44,6	0,5	54,9	54,8	0,1	49,7	49,8	— 0,1
61,7	61,3	0,4	57,2	57,1	0,1	57,9	58,0	— 0,1
55,0	54,6	0,4	63,1	63,0	0,1	56,9	57,1	— 0,2
56,1	55,8	0,3	58,9	58,8	0,1	57,9	58,2	— 0,3

Da nun entsprechend der Tabelle in 32 unter 33 Fällen die Differenz 0,6 Skalenteile oder weniger beträgt, in 10 Fällen sogar wegfällt, bzw. negativ wird, so würde die Verdünnung des Plasmas — seinen mittleren Brechungswert mit 60,0 veranschlagt — nur in ganz seltenen Fällen mehr als etwa $^1/_{100}$ betragen, wenn der Eigenbrechungswert des Salzes in Wegfall käme. Da dieser aber zu groß ist, um Vernachlässigung erfahren zu können, muß die Differenz um diesen Wert vergrößert eingeschätzt werden. Der Eigenbrechungswert des Natriumzitrats ist mit 0,4 Skalenteilen pro 0,1 % Konzentration zu beziffern, und zwar, wie aus folgender Tabelle hervorgeht, sowohl bei Verwendung von Wasser als auch Plasma als Lösungsmedium im Sinne einfacher Addition zum Ausgangswert.

Methodik: Gewinnung von Nativplasma (NP) mittels paraffinierten Instrumentarismus, Zusatz von gepulvertem Natriumzitrat in Konzentrationen von 0,1 bis 0,4 %. Vergleich mit äquivalenten Konzentrationen in wässeriger Lösung.

Tabelle II.

Konzentration des Na citr. %	0	0,1	0,2	0,3	0,4
NP	63,4	63,8	64,2	64,6	65,0
Destilliertes Wasser . .	15,0	15,4	15,8	16,2	16,6

Bei Annahme gleichmäßiger Verteilung des zum Vollblut gesetzten Salzes in 0,2 proz. Konzentration auf das Gesamtblut würde sich demgemäß der Wert 0,6 um 0,8 auf 1,4 vergrößern, bei Annahme ausschließlicher Aufnahme des Salzes vom Plasma hingegen würde sich die Vergrößerung nicht mit 0,8, sondern mit 1,6 beziffern lassen, da das Salz dann keine 0,2-, sondern eine 0,4 proz. Konzentration innehielte. Im letzteren ungünstigsten Falle betrüge dann die Verdünnung, an der Brechungsdifferenz gemessen, 2,2 Skalenteile, wäre also im Sinne des früheren Beispiels statt mit $^1/_{100}$ mit $^1/_{30}$ zu veranschlagen.

Tatsächlich ist sie sicherlich viel geringer, da erstens die einfache Brechungsdifferenz in den weitaus meisten Fällen bedeutend kleiner als 0,6 ist und durch rasche Verarbeitung des Salzblutes im Sinne möglichst schneller Trennung des Plasmas vom Blutkörperchensediment noch weiter herabgedrückt werden kann — denn je länger beide Bestandteile in Berührung bleiben, desto ausgeprägter gelangt der Wassereinstrom aus den Erythrocyten zur Beobachtung — und weil zweitens nicht alles zugesetzte Salz im Plasma verbleibt. Es läßt sich also feststellen, daß selbst unter ungünstigsten Bedingungen die durch die Verdünnung bewirkte Verringerung des Fibrinogengehaltes bei Mengen bis 0,3 g-Proz. höchstens Werte von 0,01 g-Proz., bis 0,6 g-Proz. höchstens von 0,02 g-Proz. und bis 0,09 g-Proz. höchstens von 0,03 g-Proz. erreichen kann, welche Fehler durch Addition von 0,01 zu den Werten der zweiten und 0,02 zu den Werten der dritten Gruppe so weitgehend aufgehoben werden, daß sie der praktischen Vernachlässigung anheimfallen dürfen.

Weiter bedarf die *Wahl des gerinnungsverhindernden Salzes* der Entscheidung, die zwischen den gebräuchlichsten: Natriumzitrat, Natriumoxalat und Natriumfluorid erfolgen kann. Die Beurteilung muß vor allem drei Gesichtspunkte berücksichtigen: 1. Die gerinnungsverhindernde Aktivität, 2. ein etwaiges Reaktionsvermögen mit Bestandteilen des Plasmas, derart, daß der Ausfall der Fibrinogenbestimmung beeinträchtigt werden könnte, 3. das Ausmaß der durch den Wassereinstrom aus den Erythrocyten bewirkten Verdünnung des Plasmas.

Ad. 1. Nach der Gewichtsprozentkonzentration würde Natriumoxalat am stärksten, Natriumzitrat am schwächsten die Gerinnung hindern, und in der Literatur gelten seit den alten Arbeiten von *Arthus* und *Pagès* (17) als Salzminima für Natriumoxalat eine 0,1 proz., für Natriumfluorid eine 0,2 proz. und für Natriumzitrat eine 0,4 proz. Konzentration, welche Werte zwar, wie schon für das Natriumzitrat hervorgehoben wurde, absolut zu hoch gegriffen sind, in ihrem Verhältnis zueinander aber den Tatsachen entsprechen. Vergleicht man aber äquimolare Konzentrationen, so genügt zwar z. B. eine solche von m/50 hinsichtlich des Natriumoxalats und Natriumzitrats, da im ersten Falle 0,027 g, im zweiten Falle 0,052 g Salz in mehr wie ausreichendem Maße 10 ccm Blut flüssig erhalten können, nicht aber hinsichtlich des Natriumfluorids, da 0,008 g die Gerinnung von 10 ccm Blut nicht zu verhindern imstande sind. Die früher angeführte Reihe hinsichtlich der Aktivität der Gerinnungshemmung würde also in: Natriumoxalat, Natriumzitrat, Natriumfluorid zu ändern sein.

Ad. 2. Setzt man zum Nativplasma oder auch zu gewöhnlichem Serum eine Spur jedes der drei Salze, so fällt beim Natriumoxalat sofort ein sehr starker, bei Natriumfluorid erst nach einiger Zeit ein schwacher Niederschlag aus, das Natriumzitrat hingegen läßt jede

auch noch so feine Trübung vermissen. Es ist klar, daß dieser Niederschlag auch im Vollblut zustande kommt, und sich, wie schon *Leendertz* hervorhob, dem Nachweis nur dadurch entzieht, daß er sich im Blutkörperchensediment verbirgt. Da nun wohl mit großer Wahrscheinlichkeit angenommen werden darf, daß dieser namentlich beim Oxalat geradezu massiv auftretende Niederschlag, wenn er auch in der Hauptsache aus Calciumoxalat besteht, labiles Plasmaeiweiß mitreißt[1]),

Tabelle III.

	Abgelesener Brechungswert	Salzeigenbrechungswert pro 0,1 % Konz.	Berechneter Brechungswert	Verdünnung
Nativplasma	66,1	—	—	—
Zitratplasma	65,6	0,4	64,0	2,1
Oxalatplasma	64,1	0,5	62,1	4,0
Fluoridplasma . . .	62,3	0,4	60,7	5,4

so muß in dieser Hinsicht das Natriumzitrat vor den beiden anderen Salzen unbedingt den Vorzug erhalten.

Ad. 3. Vergleicht man das Ausmaß der durch den Salzzusatz bewirkten Herabsetzung des Brechungsvermögens, so läßt sich bei Verwendung einer 0,2proz. Konzentration die stärkste Verminderung des Brechungswertes beim Fluorid, die geringste beim Zitrat beobachten, wie aus folgendem Protokoll, das als Beispiel für eine Reihe durchaus gleich verlaufender Versuche dienen möge, zu ersehen ist. (Tab. III.)

Das berechnete Brechungsvermögen wurde durch Subtraktion des Eigenwertes der Salze vom abgelesenen Brechungswert gewonnen, wobei wie oben die Salze als nur im Plasma gelöst angenommen wurden, wodurch sich die Konzentration auf das Doppelte erhöht. Daß für diese um so viel ausgeprägtere Verminderung des Brechungsvermögens bei Verwendung von Oxalat und Fluorid nicht etwa die Ausfällung von Oxalat- bzw. Fluoridkalk als Ursache herangezogen werden darf, obwohl dieser Vorgang das Endergebnis natürlich im gleichen Sinne mitbeeinflußt, geht schon daraus hervor, daß die Ausfällung am umfangreichsten beim Oxalat, die Brechungsverminderung aber beim Fluorid zur Beobachtung gelangt. Da aber eine andere Erklärung, nachdem sich für eine konstitutiv bedingte Brechungsänderung des Mediums durch das zugeführte Salz keine Anhaltspunkte ergaben, wohl nur auf Verschiebungen des Wassers zwischen Blutkörperchen und Plasma zurückgeführt werden kann, scheint es berechtigt, die Herabsetzung des Brechungswertes als orientierendes Maß der jeweils bewirkten

[1]) In zwei diesbezüglichen Untersuchungen konnte allerdings der direkte Beweis dafür nicht erbracht werden, da die Fibrinogenmengen die aus Zitrat-, Fluorid- und Oxalatplasma gewonnen wurden, übereinstimmende Werte ergaben.

Verdünnung heranzuziehen und entsprechend der hier gegebenen Fragestellung dem Zitrat den Vorzug vor Oxalat und Fluorid einzuräumen.

Zusammenfassend läßt sich also feststellen, daß von den gebräuchlichsten gerinnungsverhindernden Salzen das Calciumzitrat bei genügend aktiver Gerinnungshemmung einerseits keinen Kalk und mit ihm andere Plasmabestandteile ausfällt, andererseits die relativ geringste Plasmaverdünnung zu bedingen scheint und daher alleinige Verwendung für sich beanspruchen darf.

Was die Gewinnung des Serums anlangt, deren kritische Beurteilung die Einführung des Differenzverfahrens zum Zwecke der Fibrinogenbestimmung erfordert, so bieten sich wieder mehrere Möglichkeiten zur experimentellen Durchführung. Das Serum kann gewonnen werden: 1. Durch Spontangerinnung des Gesamtblutes oder einzelner seiner Bestandteile, 2. durch künstlich bewirkte Gerinnung ursprünglich an der Gerinnung gehinderten Blutes oder einzelner seiner Bestandteile.

Ad. 1. Seit einer kürzlich erfolgten sehr wertvollen Mitteilung von *Leendertz* (18) ist als bis dahin niemals berücksichtigtes Faktum bekannt geworden, daß *Nativserum* ein verschiedenes Brechungsvermögen aufweist, je nachdem seine Gewinnung durch Gerinnung des Gesamtblutes oder des Nativplasmas allein erfolgt, und zwar derart, daß bei ersterem (Vollblutserum = VBS) ein geringeres Brechungsvermögen zur Beobachtung gelangt, als bei letzterem (Plasmaserum = PS); als wahrscheinlichste Ursache wurde von *Leendertz* eine Verdünnung des VBS durch eine etwa mechanisch zu erklärende Wasser- bzw. Wasser-Salzauspressung aus den vom sich zusammenziehenden Fibrinnetz umschlossenen Erythrocyten angenommen, hinsichtlich deren näherer Begründung auf die Originalarbeit verwiesen sei. Da nun *Leendertz* mit Recht darauf aufmerksam macht, daß diese stattgehabte Verdünnung die Verwendung des bis jetzt üblichen VBS als „Serum" im Rahmen eines Differenzverfahrens zum Zweck der Fibrinogenbestimmung nicht erlaubt, habe ich die Angaben von *Leendertz* sofort nachgeprüft und dabei als Ergebnis festgestellt, daß sich das Brechungsvermögen des PS tatsächlich meistens von dem des VBS, oft sogar sehr erheblich, unterscheidet, aber nicht nur im Sinne der Relation PS $>$ VBS, sondern auch entsprechend dem Verhältnisse PS $<$ VBS. In Anbetracht der grundsätzlichen Wichtigkeit dieser Frage für viele serochemische Untersuchungen seien meine Resultate kurz tabellarisch zusammengestellt.

Methodik: Blutentnahme durch Punktion der Armvene. Gewinnung des VBS durch Spontangerinnung des einen Teiles, Gewinnung von PS durch Spontangerinnung des unter Berücksichtigung der später zu erörternden Technik erhaltenen Nativplasmas aus dem anderen Teile der Blutprobe.

Tabelle IV.

PS	VBS	Differenz	PS	VBS	Differenz	PS	VBS	Differenz	PS	VBS	Differenz
56,9	55,9	1,0	62,0	61,8	0,2	64,3	64,3	0,0	55,5	55,8	— 0,3
56,9	56,3	0,6	61,4	61,2	0,2	57,3	57,3	0,0	58,2	58,6	— 0,4
63,9	63,3	0,6	59,0	58,8	0,2	61,1	61,1	0,0	62,7	63,1	— 0,4
59,0	58,4	0,6	62,0	61,8	0,2	60,1	60,1	0,0	62,1	62,5	— 0,4
58,0	57,5	0,5	60,2	60,1	0,1	60,5	60,5	0,0	56,6	57,0	— 0,4
61,7	61,2	0,5	60,8	60,7	0,1	45,5	45,5	0,0	54,5	54,9	— 0,4
61,0	60,5	0,5	62,1	62,0	0,1	60,1	60,1	0,0	61,2	61,8	— 0,6
53,8	53,4	0,4	59,1	59,0	0,1	51,9	51,9	0,0	57,4	58,0	— 0,6
60,6	60,3	0,3	61,0	60,9	0,1	65,5	65,5	0,0	59,0	59,6	— 0,6
59,7	59,4	0,3	48,0	47,9	0,1	57,4	57,4	0,0	51,2	52,0	— 0,8
60,7	60,4	0,3	49,9	49,9	0,0	54,5	54,6	— 0,1	63,0	63,8	— 0,8
56,8	56,6	0,2	62,0	62,0	0,0	59,4	59,6	— 0,2	57,6	59,0	— 1,4

Die Betrachtung der Tabelle ergibt, daß unter 48 Untersuchungen 22mal Unterschiede im Sinne PS > VBS, deren Ausmaß in 19 Fällen 0,5 Skalenteile nicht überbot, und 14mal Unterschiede im Sinne PS < VBS, deren Wert 8mal unter 0,5 lag, zur Beobachtung gelangten, während 12 Untersuchungen jede Differenz vermissen ließen. Daraus läßt sich für den hier verfolgten Zweck als Forderung ableiten, daß eine Verwendung von VBS im Rahmen eines Differenzverfahrens zur Ermittlung des Fibrinogens nicht mehr am Platze ist.

Was die Ursache dieses Phänomens anlangt, so möchte ich hier nur so viel bemerken, daß sie ihre volle Erklärung in der Annahme eines einseitigen Wasser-Salzeinstroms aus den Blutkörperchen ins Plasma auf Grund mechanischer Auspressung kaum finden dürfte. Dagegen spricht schon, abgesehen von dem oben mitgeteilten Ergebnis, daß in vielen Fällen das Plasmaserum sogar geringere Brechungswerte als das VBS aufweist, schon die experimentelle Prüfung folgender Überlegung: Wenn die von *Leendertz* gegebene Annahme in vollem Ausmaße zu Recht bestände, müßte sich der supponierte Wasser-Salzeinstrom besonders geltend machen, wenn jenes Serum auf sein Brechungsvermögen untersucht würde, das durch Gerinnung des vorher seines meisten Nativplasmas beraubten Blutrestes, der also eine maximale Verschiebung der Relation Blutkörperchenvolum/Plasmavolum zugunsten des ersteren aufweist, gewonnen wurde. Dies ist nun nicht der Fall, wie aus der folgenden Tabelle erwiesen werden kann.

Methodik: Wie oben. Bestimmung des Brechungsvermögens von PS, VBS und außerdem noch jenes Serums, das bei Spontangerinnung der zum Zwecke der PS-Gewinnung des größten Teiles (mindestens zwei Drittel) ihres Nativplasmas beraubten Blutprobe (VBS-Rest = VBSR) erhalten wurde.

Tabelle V.

	PS > VBS						PS = VBS					PS < VBS
	VBS < VBSR						VBS < VBSR		VBS = VBSR			VBS > VBSR
	VBSR > PS		VBSR = PS				VBSR > PS		VBSR = PS			VBSR > PS
PS . . .	61,4	59,0	61,7	62,0	56,8	49,6	60,1	62,0	45,5	60,0	57,3	62,1
VBSR .	61,7	59,4	61,7	62,0	56,8	49,6	60,4	62,1	45,5	60,0	57,3	62,2
VBS . .	61,2	58,4	61,2	61,8	56,6	49,3	60,1	62,0	45,5	60,0	57,3	62,5

De Durchsicht der Tabelle ergibt also durchweg ein entweder gleiches oder höheres, niemals aber geringeres Brechungsvermögen des VBSR gegenüber dem PS und dies sowohl bei jenen Fällen, in denen der Brechungswert des PS den des VBS überragt, als auch in jenen, wo beide Werte gleiche Größe aufweisen, während bei der einzigen zur Beobachtung gelangenden Blutprobe, die die Formel PS < VBS erkennen ließ, der Brechungswert des VBSR zwar niedriger als der des VBS, immer aber noch höher als der des PS war.

Daraus läßt sich folgern, daß das Wesen des ganzen Vorganges, der jedenfalls genaueres Studium verdient und manche Frage des Gerinnungsmechanismus neu beleuchten kann, zusammengesetzter Art ist, derart, daß der Wasser-Salzeinstrom, der ja mit größter Wahrscheinlichkeit als Ursache anzusehen ist, nicht immer nur nach einer Richtung erfolgt, also kaum seine Bedingungen in einer mechanischen Auspressung aus den Erythrocyten allein findet, sondern nach beiden Richtungen sich wenden kann, entsprechend der jeweiligen Störung des Gleichgewichtes der Verhältnisse, die wir als Regulatoren osmotischer Vorgänge kennen.

Ad. 2. Die Gewinnung von Serum kann erfolgen a) aus Hirudinplasma, b) aus Salzplasma; sie kann bewirkt werden a) durch Spontangerinnung, b) durch künstliche Fermentgerinnung, die als für den hier verfolgten Zweck ungeeignet, ausgeschaltet werden kann; c) durch Rekalzifikation, d) durch Erwärmung auf 56^0; der Fällungstemperatur des Fibrinogens.

Die Gewinnung von *Hirudinserum* aus Hirudinplasma würde an sich den großen Vorteil bieten, daß die gewisse technische Schwierigkeiten verursachende Darstellung des PS in Wegfall käme, da der nach Entfernung der zur Plasmabestimmung notwendigen Plasmamenge übrigbleibende Rest leicht von dem Blutkörperchensediment getrennt und selbständig der Gerinnung überlassen werden kann, die im allgemeinen nach etwa einer Stunde spontan abgelaufen ist. Steht also Hirudin überhaupt zur Verfügung, so wäre diese Art der Serumgewinnung an und für sich von Vorteil, doch wird sie dadurch unmöglich gemacht, daß das Hirudin in vielen Fällen einen Teil des Fibrinogens irreversibel stabilisiert, d. h. es gelingt weder durch Spontangerinnung, noch durch Erwärmung auf 58^0, diejenige Menge Fibrinogen auszufällen, die das gleiche Plasma, mit anderer Methodik geprüft, enthält. Über das quantitative Ausmaß des durch das Hirudin physikalisch-chemisch veränderten Fibrinogens wird später zu berichten sein.

Was die Gewinnung von *Salzserum* anlangt, so kann die Spontangerinnung technisch deshalb nicht zur Anwendung kommen, da ihr Ablauf nicht berechnet werden kann, sehr oft sogar bei Verwendung kleinster Salzmengen selbst nach Tagen kein Ergebnis aufweist. Re-

kalzifikation und Erwärmung hingegen ergeben im Differenzverfahren gleiche Fibrinogenwerte, welches Resultat vorweg genommen sei und als wechselseitige Begründung der Tauglichkeit beider Verfahren einstweilen gelten darf. Zusammenfassend läßt sich also hinsichtlich der Serumgewinnung aus künstlich ungerinnbar gemachtem Blute feststellen, daß, wenn überhaupt, nur auf 56° erwärmtes oder rekalzifiziertes Salzplasma ein brauchbares Ausgangsmaterial darstellt.

Nach diesen Feststellungen über die Gewinnung und Verwertung des Ausgangssubstrates, die mir vor allem geboten erschien, kann nun an die kritische Erörterung der Methodik selbst gegangen werden. Dabei sei zuerst im allgemeinen festgestellt, daß die Anwendung aller jener Methoden, die große Mengen Ausgangsmaterial erfordern, wie die Verfahren von *Pfeiffer-Kossler*, *Reye*, *Porges-Spiro* von vornherein den schweren Nachteil mit sich bringen, Serienuntersuchungen an derselben Versuchsperson innerhalb kurzer Zeit nicht zu gestatten; sie müssen daher schon aus diesem Grunde eine Einschränkung ihrer Anwendbarkeit erfahren.

Was nun die Bewertung der *Leistungsfähigkeit der einzelnen methodischen Hauptverfahren* anlangt, so lassen sich mit der *Gravimetrie* nach meiner Erfahrung nur bei Verwendung von Makromethoden gute Resultate gewinnen, wobei ich unter Makromethoden solche verstehe, die zu ihrer Durchführung mindestens 4 bis 5 ccm Plasma erfordern; denn bei Verwendung kleinerer Mengen Ausgangsmaterials wird die zur Messung gelangende Menge Fibrinogen so klein, daß schon ganz geringe Fehler der technischen Durchführung, wie sie kaum vermeidbar sind, das Endergebnis in einer Weise ändern, daß erst große Unterschiede zwischen verschiedenen Bestimmungen als sichere Ausschläge gewertet werden können; wäre z. B. der Fibrinogengehalt eines Plasmas mit 0,24 g-Proz. zu veranschlagen, so würden 2,0 ccm des ersteren 0,0048 g des letzteren enthalten, so daß eine Verschiebung des Resultates um $\pm$ 0,0005 g wie sie durch ungenügende Trocknung, durch Schwierigkeiten bei Veraschung und Rückwägung zur Bestimmung des Salzfehlers, der von manchen Autoren (*Gram*) übrigens völlig vernachlässigt wird, oft nur zu leicht eintritt, bereits völlig unverwertbare Ergebnisse erzielt. Dazu kommen noch Fehlerquellen, die für jede direkte Fibrinogenbestimmung an kleinen Mengen (also auch für die direkte Kjeldahlbestimmung) gelten und ihre Ursachen in der technischen Unmöglichkeit finden, z. B. jede Zell- und Plättchenbeimengung oder kleinste Substanzverluste bei Abpressung der Fällung zwischen Filterpapier mit Sicherheit auszuschließen.

Zur Methodik von *Gram* möchte ich noch weiter bemerken, daß mir die Verwendung der Torsionswage zur Wägung solch kleiner Mengen nicht angebracht scheint, da man unter Zugrundelegung des oben

erwähnten Beispiels den Fibrinogengehalt überhaupt nur auf 0,05 g-Proz. genau zu bestimmen imstande ist. Denn die *Bang*sche Torsionswage verzeichnet als kleinste Maßeinheit 0,001 g, welche Gewichtsmenge bei Verwendung von 2,0 ccm Plasma einem Fibrinogengehalt von 0,05 g-Proz. entspricht.

Die Leistungsfähigkeit des *Kjeldahlverfahrens* hängt vor allem einerseits von der Entscheidung für das direkte oder Differenzverfahren, andererseits von der Wahl der in Anwendung gebrachten Methodik im Sinne der Makro- oder Mikrobestimmung des N ab. Was den ersten Punkt anlangt, so ist es verständlich, daß das Differenzverfahren zwei schwere Nachteile gegenüber der direkten Bestimmung aufweist: erstens, eine Verdopplung aller technischen und methodischen Fehlerquellen an sich als Folge der Abhängigkeit der Differenz von zwei Ausgangswerten, zweitens die methodisch bedingte Notwendigkeit der Bestimmung sehr kleiner absoluter Fibrinogenmengen. Hinsichtlich des zweiten Punktes muß die Erwägung gelten, daß, wenn möglich, an Stelle der Makrobestimmung eine Mikrobestimmung in Anwendung gebracht wird, für deren Durchführung das *Pregl*sche Verfahren im Hinblick auf unseren Zweck als Methodik der Wahl gelten kann.

Die Beurteilung der Leistungsfähigkeit des direkten Verfahrens auf Grund der N-Bestimmung nach *Pregl* ergibt sich aus folgender Überlegung: Da 1,0 ccm der vorgelegten n/70 Lauge 0,0002 g N entspricht und an der Bürette als kleinste Einheit 0,01 ccm abgelesen werden kann, läßt sich die geringste durch Titration feststellbare Menge N mit 0,000002 g beziffern[1]). Enthielte nun das zu untersuchende Plasma 0,24 g-Proz. Fibrinogen, die bei Verarbeitung von 1,0 ccm Plasma einer absoluten Menge von 0,0024 g Fibrinogen entsprechen (0,00038 g N), so würde sich die theoretische Fehlermöglichkeit um $\pm$ 0,0000125 mg Fibrinogen bewegen, was eine Fehlerquelle von 0,5% entsprechend 0,00125 g-Proz. ergibt; tatsächlich erfährt dieses ausgezeichnete Ergebnis allerdings noch insofern eine Einschränkung, als die Titration in Anbetracht der Breite des Farbumschlages praktisch nicht bis zu einer Genauigkeit von 0,01 ccm, sondern nur etwa bis 0,05 (= $^1/_{20}$ ccm) verbrauchter Lauge getrieben werden kann. Damit vergrößert sich zwar die Fehlermöglichkeit auf das Fünffache, also nach obiger Rechnung auf $\pm$ 2,6%, entsprechend 0,00625 g-Proz., ohne aber die Güte des Resultates für den praktischen Gebrauch zu beeinträchtigen, für den eine Genauigkeit bis zur zweiten Dezimale völlig genügt.

Gänzlich ungünstig hingegen stellt sich das Ergebnis des Differenzverfahrens bei Verwendung der *Pregl*schen Methodik dar. Denn da Plasma- bzw. Serummengen von mehr als 0,1 ccm bereits Schwierigkeiten

---

[1]) Nach *Pregl*, Handb. d. biochem. Arbeitsmethoden.

bei der Verbrennung verursachen, würde sich, falls der Plasmaeiweißgehalt z. B. 8,44, der Serumeiweißgehalt 8,20 g-Proz. betrüge, die im Differenzverfahren zur Bestimmung gelangende absolute Eiweißmenge mit 0,00844 g für das Plasma und 0,00820 g für das Serum beziffern. Auf Grund der oben ermittelten Fehlermöglichkeit von 0,0000125 g Eiweiß, die natürlich für die Plasma- *und* Serumbestimmung Berücksichtigung finden, also verdoppelt werden muß, würde einer absoluten Fibrinogenmenge von 0,00024 g ein Fehlerwert von ± 0,000025 gegenüberstehen, was einem Prozentverhältnis von 10,5 entspricht. Da nun dieser Wert nach den früheren Ausführungen in Wirklichkeit um das Fünffache zu klein berechnet wurde, ergibt sich eine solche Fehlermöglichkeit, daß den derart ermittelten Ergebnissen jede Berechtigung zur Verwertung abzusprechen ist.

Um also mit Hilfe der Kjeldahlmethodik im Differenzverfahren brauchbare Resultate zu gewinnen, ist die Verarbeitung von mindestens je 2,0 ccm Plasma und Serum und damit die Verwendung eines Makroverfahrens notwendig. Die dazu nötige Blutmenge ist mit etwa 10 ccm zu veranschlagen, so daß Serienuntersuchungen kaum mehr zur Durchführung gelangen können.

Während also nach diesen Gesichtspunkten die Methodik von *Cullen-van Slyke* alle Bedingungen erfüllt, möchte ich hinsichtlich des Verfahrens von *Howe*, das sich von ersterem nur durch Verwendung kleinerer Mengen Ausgangsmaterials unterscheidet, bemerken, daß für diese Abänderung kein Grund vorliegt, da 1,0 ccm Plasma ebenso leicht zu gewinnen ist, bei der Verarbeitung aber große technische Vorteile gewährt. Was die Fibrinogenbestimmung von *Fåhraeus* anlangt, so verursachen allein der nicht vermeidbare Einschluß von Zellen und die Art der Extraktion eine solche Reihe von Fehlerquellen, daß ihre Resultate kaum Verwertung finden können.

Der Kritik der *refraktometrischen Methodik* endlich kann folgende Erwägung zugrunde gelegt werden: Die Ablesung des Brechungswertes für Plasma und Serum erfolgt mit einer Genauigkeit von ± 0,05 Skalenteilen, so daß der größte im Differenzverfahren zur Auswirkung gelangende Ablesefehler ± 0,1 Skalenteil beträgt. Erfolgt nun die Umrechnung auf Eiweiß unter Zugrundelegung der Relation: 0,1 Skalenteil = 0,0215 g-Proz. Eiweiß, so ergibt sich für die Bewertung des Fibrinogengehaltes ein Fehlerbereich von ± 0,02 g-Proz. Ob dieser *Reiss*sche mittlere Umrechnungskoeffizient für Serumeiweiß auch für das Fibrinogen angewendet werden darf, wurde bis jetzt angenommen, ist jedoch experimentell noch nicht nachgewiesen. Doch selbst für den Fall, daß sich kleine Abweichungen des Brechungsvermögens des Fibrinogens vom Brechungsvermögen des Serumeiweißes, in dessen Rahmen ja ein minimaler Unterschied zwischen Globulin und Albumin

schon festgestellt ist, ergeben würden, die dann selbstverständlich die entsprechende Korrektur des Umrechnungsfaktors zur Folge haben müßten, — ich bin derzeit mit Untersuchungen über das Brechungs- und Drehungsvermögen des Fibrinogens beschäftigt —, so würde dadurch die vergleichende Bewertung der Resultate keinen Eintrag erleiden, da der Faktor immer in gleicher Weise zur Berechnung verwendet wird. Damit fällt gleichzeitig der Einwand, daß es nicht angängig sei, das Brechungsvermögen des Plasmaeiweißes und Serumeiweißes nach gleichen Gesichtspunkten zu verwerten. Daß schließlich zeittechnisch die Refraktometrie alle anderen Methoden weit überragt, braucht nicht besonders hervorgehoben zu werden.

Zusammenfassend läßt sich also hinsichtlich der technischen Leistungsfähigkeit aller drei Methoden sagen, daß bei Verarbeitung kleiner Blutmengen die direkte Kjeldahlbestimmung des Fibrinogens zwar die genauesten Resultate vermittelt, jedoch auch die refraktometrische Bestimmung im Differenzverfahren ein genügend gutes Ergebnis zu verzeichnen hat, um volle Verwertung im klinischen Gebrauche zu finden, wozu sie außerdem ihre leichte und schnelle Durchführung ganz besonders eignet. Die Kjeldahlbestimmung im Differenzverfahren ergibt nur bei Verarbeitung großer Mengen Ausgangsmaterials brauchbare Resultate und auch die Gravimetrie erfordert, abgesehen von umständlicher und verhältnismäßig schwieriger Durchführung, relativ große Mengen Blutes, wenn sie gute Ergebnisse liefern soll.

Aus diesem Grunde soll im folgenden letzten Abschnitt über Untersuchungen berichtet werden, die einerseits den Zweck verfolgen, die *refraktometrische Methodik der Fibrinogenbestimmung* zu prüfen und auszubauen, andererseits aber auf Grund ihrer Ergebnisse imstande sind, manche allgemein methodische Fragen der quantitativen Ermittlung des Fibrinogens zur Entscheidung zu bringen und schließlich zur Klärung der eingangs gegebenen Fragestellung beizutragen.

Zur refraktometrischen Bestimmung des Fibrinogens kann Nativplasma, Hirudinplasma und Salzplasma verwendet werden.

Die Verarbeitung von Nativplasma hat bis jetzt keinen Eingang gefunden, obwohl sie aus schon früher dargelegten Gründen allen anderen vorzuziehen ist; andererseits kann die Bestimmung von Nativplasma überhaupt nur im Rahmen der Refraktometrie zur Durchführung gelangen, wie ebenfalls schon hervorgehoben wurde. Schließlich war die Notwendigkeit, Nativplasma in den Bereich der Untersuchung zu ziehen, deshalb gegeben, weil erst durch die Verarbeitung dieses Materials sichere Anhaltspunkte für eine Kritik jener Resultate zu gewinnen waren, die die Verwendung künstlicher Plasmen lieferte.

Die *Technik zur Gewinnung von Nativplasma* gestaltet sich derart, daß durch Punktion der Armvene ohne, bzw. mit nur geringer vorheriger

Stauung, die aber vor der Blutentnahme wieder gelöst werden soll, mittels paraffinierter[1]) Kanüle und Spritze mindestens 4 ccm Blut[2]) entnommen, in ein paraffiniertes Gläschen nach vorheriger Abnahme der Kanüle und ohne Bildung von Blutschaum gebracht und sofort mit etwa 2000 bis 3000 Touren etwa 5 Minuten zentrifugiert werden, nach welcher Zeit sich im allgemeinen 1 bis 1½ ccm Nativplasma abgesetzt haben; dieses wird mit paraffinierter Pipette abgehoben und nach vorheriger Beschickung des Hilfsprismas in ein frisches Gläschen zur Gewinnung von PS übertragen. Es empfiehlt sich, während der Refraktometrie des Nativplasmas die Temperatur des Wasserbades in den ersten Minuten tief (etwa auf 10°) zu halten, wodurch eine raschere Abkühlung des eingeschlossenen Plasmas erfolgt, und erst nach 3 bis 4 Minuten auf 17,5° zu erhöhen. Bei guter Technik, die vor allem in peinlichster Sauberkeit (Staubfreiheit) der zur Verwendung gelangenden paraffinierten Gefäße besteht, gelingt es auf diese Weise fast ohne Ausnahme, die Bestimmung des Brechungsvermögen vor Eintritt der Gerinnung, die in der Regel etwa 15 bis 20 Minuten nach Füllung des Refraktometers erfolgt, zu Ende zu führen. Die Bestimmung des Serumwertes erfolgt am zugehörigen PS.

Was die *Verwendung des Hirudinplasmas* zum Zwecke der Bestimmung des Fibrinogens anlangt, so wurde sie bis jetzt ausschließlich im Rahmen der alten *Winternitz*schen Methodik geübt. Ihre kritische Prüfung mußte vor allem den Nachweis erbringen, den *Winternitz* selbst zu führen nicht versucht hatte, daß das in Substanz zugesetzte Hirudin das Brechungsvermögen des Plasmas nicht beeinflußt. Dies ist nun tatsächlich der Fall, wie die nachfolgende Tabelle auf Grund der Nebeneinanderstellung der Brechungswerte des aus der gleichen Blutprobe gewonnenen Nativ- und Hirudinplasmas erweist.

Tabelle VI.

NP . . .	61,35	61,75	61,3	63,1	64,5	57,5	57,9	57,2	60,15	62,5
HP . . .	61,35	61,75	61,3	63,1	64,45	57,5	57,9	57,1	60,2	62,5

Eine Verbesserung des Verfahrens muß jedoch hinsichtlich der Gewinnung des Serums im Sinne der Verwendung von PS an Stelle des VBS Platz greifen. Denn wenn auch, wie aus Tabelle VI hervorgeht, machmal gar keine, oder zum mindesten nur geringe Verschiedenheiten zwischen beiden Werten zur Beobachtung gelangen, so können diese Differenzen doch in vielen Fällen gänzlich irrige Resultate verursachen, und zwar im Sinne sowohl einer scheinbaren Verringerung als auch Vermehrung des Fibrinogens. Bemerken möchte ich jedoch, daß bei Bestimmungen an der gleichen Versuchsperson zu verschiedenen Zeiten, die relative Beziehung der einzelnen Werte untereinander auch bei Verwendung von VBS insofern keine wesentliche Veränderung

[1]) Als beste Mischung hat sich mir das Verhältnis Paraffini solidi 2 auf Paraffini liquidi 1 bewährt.

[2]) Kleinere Blutmengen kommen leichter zur Gerinnung.

erfährt, als das Verhältnis des Brechungsvermögens von PS zu VBS am gleichen Menschen bei verschiedenen Blutentnahmen innerhalb nicht allzu langer Zeiten kaum Schwankungen aufzuweisen scheint.

Daß Hirudinserum (HS) trotz manchen technischen Vorteils keine Verwendung finden kann, wurde schon im vorigen damit begründet, daß durch Hirudin ein Teil des Fibrinogens irreversibel stabilisiert wird und weder bei Spontangerinnung, noch bei Erwärmung auf 55° zum völligen Austritt aus der Lösung gezwungen werden kann. Der experimentelle Nachweis ergibt sich aus Tabelle VII.

Methodik: Die Gewinnung von HS erfolgte in den ersten 11 Fällen durch Spontangerinnung des Hirudinplasmas (HP), in den letzten vier Fällen durch Erwärmung auf 55°, die Fällungstemperatur des Fibrinogens, während 5 Minuten. Die Resultate fanden nur in solchen Fällen Verwertung, in denen die Sera auch nach 24 Stunden den Eintritt nachträglicher Gerinnungserscheinungen vermissen ließen.

Tabelle VII.

HP . . .	57,4	61,7	54,9	61,7	60,4	61,35	57,9	62,5	61,75	48,0	58,9	57,2	62,4	58,2	58,1
PS . . .	54,5	60,2	52,3	59,0	59,0	60,5	54,5	60,8	61,0	45,5	56,8	54,4	60,1	57,1	57,0
HS . . .	57,2	61,0	52,7	59,3	59,3	60,8	54,8	61,1	61,1	45,5	56,8	56,1	61,1	57,7	57,0
Nicht ausgefälltes Fibrinogen	2,7	0,8	0,4	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,1	0,0	0,0	1,7	1,0	0,6	0,0

Die *Winternitz*sche Methode liefert demnach bei Verwendung von PS ebenso gute Werte wie das auf Verarbeitung von Nativplasma beruhende, oben angegebene Verfahren und ist diesem, falls Hirudin wieder erhältlich sein wird, an Leichtigkeit der technischen Durchführung überlegen.

Die *Verwendung von Salzplasma* schließlich fand vor kurzem, wie z. B. aus der Stellungnahme *Naegelis* (19) hervorgeht, völlige Ablehnung, was jedoch darauf zurückzuführen ist, daß sie in gänzlich ungeeigneter Weise vorgenommen wurde. Denn beim Vergleich von Salzplasma mit nativem Serum darf es in Anbetracht der früheren Ausführungen nicht Wunder nehmen, daß bei geringem Fibrinogengehalt das Brechungsvermögen des Plasmas hinter dem des Serums vielfach zurückbleibt, eine Berechnung des Fibrinogens also überhaupt nicht erfolgen kann. Nur wenn Nativsalzplasma zur Verwendung kommt, das durch Zusatz des Salzes in Substanz zum Nativplasma gewonnen wird, so daß der bekannte Eigenbrechungswert des Salzes wieder in Abrechnung gebracht werden kann[1]), darf die Gegenüber-

[1]) Voraussetzung dafür ist allerdings, daß weitere größere Vergleichsreihen, über die ich noch nicht verfüge, ausnahmslos dasselbe Resultat wie die durch das Beispiel der Tabelle II vertretenen Versuche ergeben, daß nämlich das Brechungsvermögen des Nativplasmas durch das zugesetzte Salz in jedem Falle rein additiv vermehrt wird.

stellung von Nativserum, das natürlich PS sein muß, erfolgen, muß sogar, wie aus dem Späteren hervorgehen wird, falls die Darstellung von Nativplasma oder Hirudinplasma nicht möglich ist, gefordert werden.

Erfolgt aber der Salzzusatz, wie bisher zum Zwecke der Salzplasmagewinnung immer, direkt zum Blut, so ist es klar, daß im Differenzverfahren nur ein in entsprechender Weise gewonnenes Salzserum zur Untersuchung herangezogen werden darf, wie im folgenden zu zeigen sein wird und worauf auch *Leendertz* (l. c.) ausdrücklich hingewiesen hat.

Was die Gewinnung des Salzplasmas und Salzserums anlangt, so kann diesbezüglich auf die vorstehenden Ausführungen verwiesen werden, doch muß die experimentelle Begründung der dort teilweise vorweg genommenen Ergebnisse hier nachgetragen werden. Bemerken möchte ich vorher nur noch dies, daß ich auf die Herstellung von Salzserum im Sinne der Methode a) von *Leendertz* deshalb verzichtet habe, weil die nachträgliche Zufügung des Salzes, namentlich wenn sie in wässeriger Lösung erfolgt, niemals mit *der* Genauigkeit zur Durchführung kommen kann, die bei Verwendung von Salzserum, das durch Entfernung des Fibrinogens aus dem vorher der Untersuchung zugeführten Plasma gewonnen wird, von vornherein gegeben ist und die sich auch *Leendertz* in seiner Methode b) zunutze macht.

Um nun die Entfernung des Fibrinogens zu bewerkstelligen, schienen vor allem zwei Wege aussichtsreich: Einerseits die Rekalzifikation, andererseits die Einwirkung der Flockungstemperatur des Fibrinogens.

Was die *Rekalzifikation* anlangt, so bildet sie, wie aus der eingangs gegebenen Übersicht hervorgeht, die Grundlage fast aller bis jetzt in Anwendung gebrachter Verfahren, und auch *Leendertz* machte sie zum Angelpunkt seiner Methodik. Ich selbst habe sie ebenfalls im Rahmen der refraktometrischen Methode vielfach durchgeführt und ging dabei derart vor, daß das nach den früher dargestellten Grundsätzen gewonnene Zitratplasma mit einer Spur kristallisierten $CaCl_2$ (etwa im Verhältnis 0,002 g auf 1,0 ccm Plasma) versetzt, sofort refraktometriert und darauf der Gerinnung überlassen wurde, nach deren Beendigung dann die Bestimmung des Brechungsvermögens am Salzserum zur Durchführung kam. Die Menge des zum Zwecke der Gerinnung zugesetzten $CaCl_2$ übt auf die Quantität des ausfallenden Fibrinogens im Rahmen nicht zu weit auseinanderliegender Grenzen keinen nachweisbaren Einfluß aus, wie folgende Tabelle VIII erweist.

Methodik: Zitratplasma (ZP) wird mit kristallisiertem $CaCl_2$, dessen Menge aus dem jeweiligen Ansteigen des Brechungsvermögens des Calcium-

zitratplasmas (CaZP) zu ersehen ist, versetzt, refraktometriert und mit dem nach erfolgter Gerinnung gewonnenen Calciumzitratserum (CaZS) verglichen.

Tabelle VIII.

ZP	47,9	—	—	—	—
CaZP . . .	—	48,4	48,6	49,9	52,7
CaZS . . .	—	47,4	47,6	48,9	51,85
Differenz .	—	1,0	1,0	1,0	0,95

Erst bei Zusatz großer Mengen, von etwa 0,01 g und mehr $CaCl_2$ pro 1,0 ccm sinkt in vielen Fällen die ausgefällte Fibrinogenmenge, und die Gerinnung erfährt eine außerordentliche Verzögerung, unter Umständen sogar eine völlige Hemmung. Wenn nun auch die Gefahr einer teilweisen Stabilisierung des Fibrinogens und dadurch bedingten Verminderung seiner ausfallenden Menge durch Verwendung nur geringer $CaCl_2$-Zusätze vermieden werden kann, so verursacht die Beherrschung des Gerinnungsablaufes, vor dessen Beginn die refraktometrische Bestimmung des rekalzifizierten Zitratplasmas ihr Ende gefunden haben muß, insofern viel größere Schwierigkeiten, als die zeitliche Beeinflussung des Gerinnungsablaufes durch Kalk für jedes Plasma durchaus individuell zur Beobachtung kommt: Während die gleiche Menge $CaCl_2$ zur gleichen Menge Plasma zugesetzt, einmal erst nach 15 oder mehr Minuten die Gerinnung bedingt und so genügend Zeit zur Durchführung der refraktometrischen Bestimmung läßt, ruft sie das andere Mal dasselbe Ergebnis schon nach 5 oder weniger Minuten hervor und verhindert derart die Beendigung der refraktometrischen Beobachtung. *Leendertz* hat in seiner letzten Mitteilung diesem Übelstand dadurch abzuhelfen versucht, daß er vor dem Calciumzusatz jeweils erst seine optimale Quantität im Reihenverfahren ermittelt, und so zwar sicher die vorzeitige Gerinnung vermeidet, dafür aber erstens eine nicht unerhebliche methodische, vor allem zeitliche Erschwerung und zweitens die Notwendigkeit der Erhöhung der erforderlichen Blutmenge in Kauf nehmen muß. Ob das Calciumchlorid, wie von *Leendertz*, in wässeriger Lösung zugesetzt wird, oder wie von mir in Substanz, ist für das Resultat, wenn im ersten Falle die Verdünnung berücksichtigt wird, gleichgültig; ich ziehe den Salzzusatz in Substanz nur deshalb vor, weil ich grundsätzlich alle Verdünnungen zu vermeiden trachte.

Auf Grund dieser geschilderten Nachteile habe ich versucht, die Rekalzifikation durch eine andere Methodik zu ersetzen, die mit technischen Vorteilen gleich gute Resultate vereinte, und habe zu diesem Zwecke auf das alte einfache, schon von *Frédérique* (20) eingeführte Verfahren der *Wärmefällung des Fibrinogens* zurückgegriffen.

Die technische Durchführung gestaltet sich derart, daß Zitratplasma refraktometriert, hierauf durch Einwirkung einer Temperatur von 56° seines Fibrinogens beraubt und nach Entfernung des Niederschlages als nunmehriges Zitratserum neuerdings auf sein Brechungsvermögen untersucht wird. Die dabei ermittelte Differenz entspricht dem ausgefällten Fibrinogen. Für die Einzelheiten der Ausführung erwiesen sich die Ergebnisse folgender Versuche maßgebend:

Vor allem mußte jene *Dauer der Wärmeeinwirkung* festgestellt werden, die einerseits alles auf diese Weise überhaupt fällbare Fibrinogen entfernt, andererseits aber das Brechungsvermögen durch Verdunstung oder etwaige Veränderungen der Plasmaeiweißkörper unangetastet läßt. Zu den folgenden Tabellen sei bemerkt, daß das jeweils mitgeteilte Protokoll als Beispiel mehrerer, mit durchweg gleichem Ergebnis abgeschlossener Versuche zu gelten hat.

Methodik: Je 1,0 ccm Zitratplasma wird durch verschieden lang andauernde Erwärmung auf 55° geflockt, der Niederschlag durch Zentrifugieren entfernt und die Brechungswerte vor und nach der Erwärmung in Vergleich gebracht. Bei jeder Probe kamen in verschiedenen Röhrchen Doppelbestimmungen zur Durchführung.

Tabelle IX.

Temperatureinwirkung	3′	5′	10′	15′	20′
ZP	49,0	—	—	—	—
ZS	47,45 47,5	47,45 47,45	47,45 47,4	47,45 47,45	47,3 47,25
Differenz .	1,55 1,5	1,55 1,55	1,55 1,6	1,55 1,55	1,7 1,75

Als Ergebnis der Untersuchung kann demnach verzeichnet werden, daß die Temperatureinwirkung innerhalb verhältnismäßig weit auseinanderliegender zeitlicher Grenzen zur Anwendung kommen kann, da einerseits — wenigstens meist — schon 3 Minuten genügen, um eine optimale Fibrinogenfällung zu erzielen, andererseits erst eine 20 Minuten dauernde Wärmebeeinflussung die ausgefällte Eiweißmenge — und zwar nur in manchen Fällen — etwas zu vergrößern scheint; in anderen Fällen hingegen kommt es bei so lange dauernder Temperatureinwirkung sogar zu einer geringen, bis höchstens 0,2 Skalenteile betragenden Erhöhung des Brechungsvermögens, die wohl in einer geringen Verdunstung ihre Erklärung findet. Ich habe deshalb als Richtungswert für die Dauer der Erwärmung eine Zeit von 5 Minuten angenommen, um mit Sicherheit einerseits eine ungenügende, andererseits eine zu ausgiebige Fällung oder Eindickung durch geringe Verdunstung zu vermeiden. Es lassen sich damit sehr gute Ergebnisse gewinnen, wie schon auf Grund der gut übereinstimmenden Doppel-

werte in Tabelle IX angenommen werden konnte und weiter aus folgender Tabelle X hervorgeht, die eine etwaige Abhängigkeit der Fibrinogenfällung von der verwendeten Plasmamenge untersuchen bzw. jene kleinste Plasmamenge, deren Verarbeitung noch gute Resultate ergibt, feststellen soll.

Methodik: Fallende Mengen Zitratplasma werden durch 5 Minuten bei 55° geflockt und aus der Differenz des Brechungsvermögens das Fibrinogen ermittelt.

Tabelle X.

Plasmamenge ccm	0,5	1,0	2,0	3,0	5,0
ZP	49,0	—	—	—	—
ZS	47,45	47,45	47,50	47,45	47,5
Differenz .	1,55	1,55	1,5	1,55	1,5

Es genügen also schon 0,5 ccm Zitratplasma, um einen störenden Einfluß der durch die Erwärmung bedingten Verdunstung mit Sicherheit auszuschalten. Unter 0,5 ccm herabzugehen, möchte ich nicht empfehlen, da ich bei so kleinen Quantitäten mehrmals die schon geschilderte Erhöhung des Brechungsvermögens beobachten konnte, die dann eine scheinbare Verminderung des Fibrinogens berechnen läßt.

Die nächste experimentelle Prüfung mußte über den *Einfluß der zugesetzten Salzmenge* Aufschlüsse gewinnen.

Methodik: Zitratplasma wird durch Zusatz von gepulvertem Natriumzitrat zu Vollblut in 0,1 bis 0,5 proz. Konzentration gewonnen und in gleicher Weise, wie oben beschrieben, weiter verarbeitet.

Tabelle XI.

Konzentration d. Na citr. in g-%	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5
ZP	65,9	66,0	66,05	66,1	66,15
ZS	63,9	63,95	64,05	64,05	64,1
Differenz .	2,0	2,05	2,0	2,05	2,05

Aus dem Protokoll ergibt sich demgemäß eine völlige Unabhängigkeit von der Höhe der Zitratkonzentration, doch muß festgestellt werden, daß in anderen Versuchen bei hoch bemessenem Salzzusatz, meist erst bei 0,6, manchmal aber schon bei 0,4 proz. Konzentration eine vermehrte Ausfällung von Eiweiß zu beobachten war, die ihre Bedingungen offenbar in der Fällungsförderung der Wärmeeinwirkung durch das Zitration findet. Es fügt sich damit dem schon eingangs bei Besprechung der Salzplasmagewinnung angeführten Gründen ein weiterer an, der die Verwendung hoher Salzkonzentrationen nicht angezeigt erscheinen läßt. Bemerken möchte ich noch, daß auch bei Nativzitratplasma gleiche Ergebnisse erzielt werden. Ich

habe im mitgeteilten Protokoll einen mit gewöhnlichem Zitratplasma durchgeführten Versuch nur deshalb als Beispiel angeführt, um die berechtigte Vernachlässigung der durch den Salzzusatz im Vollblute hervorgerufene Verdünnung neuerdings im Experiment zu erweisen.

Um schließlich die Leistungsfähigkeit der Wärmefällung für unseren Zweck mit Sicherheit darzutun, mußte endlich der Nachweis erbracht werden, daß die durch ihre Anwendung gewonnenen Fibrinogenwerte völlige *Übereinstimmung mit* den mittels der *Rekalzifikation* erhaltenen zeigen. Dies ist nun, wie Tabelle XII erweist, in der Tat der Fall.

Tabelle XII.

ZP	ZS	Differenz	CaZP	CaZS	Differenz
57,55	55,4	2,15	57,8	55,7	2,1
63,45	61,5	1,95	63,8	61,9	1,9
58,0	56,6	1,4	58,4	57,0	1,4
60,9	59,6	1,3	61,2	60,0	1,2
52,5	51,45	1,05	53,0	52,0	1,0
56,2	55,2	1,0	56,6	55,6	1,0
63,5	62,5	1,0	63,8	62,8	1,0
47,9	46,9	1,0	48,4	47,4	1,0
53,6	52,75	0,85	54,5	53,6	0,9
60,1	59,3	0,8	61,3	60,5	0,8

Da also die Wärmefällung nach dem Dargelegten einerseits den Vorzug sowohl einfacherer als auch genauerer technischer Durchführung gegenüber der Rekalzifikation für sich beanspruchen darf, andererseits aber mit den durch letztere gewonnenen Resultaten volle Übereinstimmung ergibt, habe ich ihr vor dieser den Vorrang eingeräumt und die *Methodik* folgendermaßen festgesetzt:

Vollblut wird mit Natriumzitrat in Substanz in 0,1 bis 0,2 proz. Konzentration versetzt, sofort scharf zentrifugiert, refraktometriert, 5 Minuten auf 55° erwärmt, wieder zentrifugiert und nochmals refraktometriert. Soll die durch den zum Vollblut erfolgten Salzzusatz bewirkte Verdünnung des Plasmas ausgeschaltet werden, so wird das Salz statt zum Vollblut zum Nativplasma zugesetzt, und zwar in 0,2 proz. Konzentration. Das übrige Verfahren bleibt unverändert.

Nach diesem Vergleiche der durch Wärme und Kalkfällung ermittelten Fibrinogenwerte schien es notwendig, die gleiche Prüfung auch auf die mittels der Nativ- und Hirudinplasmamethodik gewonnenen Resultate auszudehnen, und hier zeigte sich das in Tabelle XIII dargestellte Ergebnis, das einerseits noch eine wichtige methodische Feststellung erlaubt, andererseits aber besonders geeignet erscheint, die Erörterung auf die eingangs gegebene Fragestellung zurückzuleiten.

Methodik: Vergleichende Fibrinogenbestimmung aus der Differenz: Hirudinplasma — Plasmaserum und Zitratplasma — Zitratserum auf Grund der im vorigen geschilderten Technik.

Tabelle XIII.

HP	PS	Differenz	ZP	ZS	Differenz
57,7	54,3	3,4	57,1	54,5	2,6
62,0	60,3	1,7	61,6	60,7	0,9
48,0	45,5	2,5	48,0	46,1	1,9
57,7	56,4	1,3	57,1	56,4	0,7
61,7	60,2	1,5	60,1	59,0	1,1
63,1	62,1	1,0	62,5	61,85	0,65
60,4	59,0	1,4	60,1	59,0	1,1
64,4	63,25	1,15	63,8	63,0	0,8
60,2	59,1	1,1	59,8	58,9	0,9
59,9	59,0	0,9	59,6	58,65	0,95
63,8	60,7	3,1	63,3	60,2	3,1
57,4	54,5	2,9	57,2	54,3	2,9
62,4	60,1	2,3	61,9	59,6	2,3
58,9	56,8	2,1	58,8	56,7	2,1
66,5	64,5	2,0	66,05	64,05	2,0
62,4	61,5	0,9	61,8	60,9	0,9
61,1	60,7	0,4	61,05	60,65	0,4
57,25	54,3	2,95	57,1	54,1	3,0
61,45	60,5	0,95	61,3	60,3	1,0
61,75	61,0	0,75	61,3	60,5	0,8

In Anbetracht der Tatsache, daß entsprechend dem eingangs gegebenen Überblick fast alle Methoden das aus dem Salzplasma abgeschiedene Fibrinogen zur Bestimmung bringen, muß das aus der Tabelle sich ergebende Resultat einigermaßen Verwunderung erregen: Denn statt der erwarteten Übereinstimmung bringen die Protokolle von 20 Paralleluntersuchungen neunmal Unterschiede zwischen den mittels der Nativ- (Hirudin-)·Plasma- und Salzplasmamethodik gewonnenen Fibrinogenwerten derart, daß die ersteren die letzteren um 0,2 bis 0,8 Skalenteile überragen.

Daraus lassen sich einerseits für die Methodik, andererseits für die Beantwortung der eingangs gegebenen Fragestellung folgende Schlüsse ableiten.

Hinsichtlich der Methodik muß in Zukunft die Forderung gestellt werden, bei jeder Blutprobe die Bestimmung des Fibrinogens im Differenzverfahren zwischen Nativ- (Hirudin-) Plasma[1]) und Plasmaserum als auch zwischen Salzplasma und Salzserum durchzuführen,

[1]) Oder mit gleichem Erfolge auch zwischen Nativsalzplasma und Plasmaserum unter Berücksichtigung des Eigenbrechungswertes des zugefügten Salzes, dessen Zusatz natürlich mit peinlichster Genauigkeit erfolgen muß und am besten eine 0,2 proz. Konzentration erreicht. Als Vorteil dieser Methodik ergibt sich gegenüber der Verwendung von Nativplasma die Unmöglichkeit des Eintrittes vorzeitiger Gerinnung, als Nachteil aber die Schwierigkeit, die als Grundlage der Berechnung dienende Salzkonzentration jeweils genau einhalten zu können.

weil einerseits — falls die Annahme, daß der durch Verarbeitung von Nativplasma ermittelte Wert infolge Fehlens jeder künstlichen Veränderung der nativen Struktur als maßgebend zu betrachten ist, zu Recht besteht — der bei Verwendung von Salzplasma ermittelte Wert als künstlich verringert anzusehen ist und somit für sich allein ein ungenügendes Resultat ergeben muß, andererseits aber seine Feststellung eine ausgezeichnete Ergänzung des auf ersterem Wege erhobenen Fibrinogenwertes darstellt, da gerade durch den Vergleich beider Werte neue Anhaltspunkte für die Beurteilung des physikalisch-chemischen Zustandes des jeweils zur Bestimmung gelangenden Fibrinogens gewonnen werden können.

Denn da aus dem differenten Ergebnis, das die Verwertung beider Verfahren vielfach ergibt, hervorgeht, daß durch den Zusatz des gerinnungsverhindernden Salzes — wie es hinsichtlich der Wirkung von Coffein, Harnstoff und anderem [*V. Kollert* und *W. Starlinger* (21)], lichtkatalytischer Einflußnahme [*W. Starlinger* (22)] schon bekannt ist, und wie ich es in dieser Mitteilung für das Hirudin gezeigt habe — ein Teil des Fibrinogens eine Veränderung erleidet, die ihm seinen Charakter als „Fibrinogen" nimmt[1]), kann der dargetane Unterschied zwischen beiden Werten als annäherndes Maß für jenen Teil des Fibrinogens angenommen werden, der bei stabilisierenden Milieuänderungen seine physikalisch-chemische Eigenart verliert und in manchem die Eigenschaften der Serumglobuline annimmt, kann also unmittelbare Angaben über den jeweiligen Stabilitätszustand des Fibrinogens — diesen als Bereitschaft, eine andere Struktur anzunehmen, aufgefaßt — vermitteln.

Zusammenfassend läßt sich also feststellen, daß bei Durchführung der Fibrinogenbestimmung mit Hilfe der zur Verfügung stehenden Methodik zwar grundsätzlich verschiedene Doppelwerte gewonnen werden, die im Sinne der vorstehenden Ausführungen den schon bekannten Befunden über fließende Übergänge zwischen den einzelnen Eiweißfraktionen des Blutplasmas ein neues Beispiel anfügen, gerade aber durch ihre vergleichende Nebeneinanderstellung eine wechselseitige Ergänzung bieten, die die Berechtigung und den Wert einer zahlenmäßigen quantitativen Feststellung nicht nur zu erweisen, sondern sogar zu erhöhen scheinen.

---

[1]) Für die Lehre von der Blutgerinnung ergibt sich daraus eine Bestätigung von Ansichten, wie sie in jüngster Zeit besonders von *Stuber* (23) vertreten wurden, daß das Wesen der durch die Salze bewirkten Gerinnungshemmung nicht in einer Kalkfällung allein, sondern auch in einer direkten physikalisch-chemischen Zustandsänderung der Fibrinogenkolloide zu bestehen scheint.

Literatur.

1) *Wo. Pauli*, Koll.-Zeitschr. **31**, 5, 1922; Math.-naturw. Kl. d. Akad. d. Wissenschaft. in Wien vom 25. Januar 1923. — 2) *Hekma*, diese Zeitschr. **62**, 1914; **73**, 1916; **74**, **77**, u. a. a. O. — 3) *Reye*, Dissertation Straßburg 1898. — 4) *Gram*, Journ. of biol. Chem. **49**, 1921; ref. Ber. ü. d. ges. Phys. u. exper. Pharm. **12**, 79, 1922. — 5) *Foster-Whipple*, Am. Journ. of phys. **58**, 1922; ref. Ber. ü. d. ges. Phys. u. exper. Pharm. **13**, 99, 1922. — 6) *Lester*, Journ. of the amer. med. assoc. **79**, 1922; ref. Ber. ü. d. ges. Phys. u. exper. Pharm. **15**, 5—6, 1922. — 7) *Pfeiffer-Kossler*, Zentralbl. f. inner. Med. 1, 1896. — 8) *Porges-Spiro*, Hofmeisters Beitr. **3**, 1901. — 9) *Cullen-van Slyke*, Proc. of the Soc. f. exper. Biol. and Med. **18**, 1916; Journ. of biol. Chem. **41**, 1920; ref. Ber. ü. d. ges. Phys. u. exper. Pharm. **2**, 316, 1920. — 10) *Fåhraeus* und *Bang*, Mikromethoden, Bergmann, Wiesbaden 1920. — 11) *Howe*, Journ. of biol. Chem. **44**, 1921; ref. Ber. ü. d. ges. Phys. u. exper. Pharm. **10**, 402, 1922. — 12) *Winternitz*, Arch. f. Derm. u. Syph. **101**, 1910. — 13) *Leendertz-Gromelski*, Arch. f. exper. Path. u. Pharm. **94**, 1922; **96**, 1923. — 14) *Leendertz*, Klin. Wochenschr. **16**, 1923. — 15) *Langstein-Mayer*, Hofmeisters Beitr. **5**, 1904. — 16) *P. Th. Müller*, ebendaselbst **6**, 1905. — 17) *Arthus-Pagès*, zitiert *Morawitz*, Blutgerinnung, in *Abderhalden*, Handb. d. biochem. Arbeitsmeth. **5**, 1, 258 ff. — 18) *Leendertz*, D. Arch. f. klin. Med. **140**, 5—6, 1922. — 19) *Naegeli*, *Schridde-Naegeli*, Hämatolog. Technik, S. 132, Fischer, Jena 1921. — 20) *Fréderique*, Paris, Gand 1877; zitiert wiederholt bei *Hammarsten*, z. B. Pflügers Arch. **19**, 1879; **22**, 1880. — 21) *Kollert-Starlinger*, Wiener klin. Wochenschr. **19**, 1922. — 22) *W. Starlinger*, ebendaselbst **44**. 1922. — 23) *Stuber*, diese Zeitschr. **126**. 1921; **134**, 1923.

Über die Bestimmung der Oberflächenspannung biologischer Flüssigkeiten mit der Torsionswage.

Von

Tyuzi Tominaga.

(Aus dem physiologischen Institut der Universität Groningen.)

(Eingegangen am 9. Juni 1923.)

Mit 2 Abbildungen im Text.

Es gibt ziemlich viele Meßverfahren für die Oberflächenspannung an der Grenzfläche Flüssigkeit — Gas.

Außer Methoden, die meist bei rein physikalischen Studien in Betracht kommen[1]), sind noch einige Methoden angegeben, welche in Biologie und Klinik brauchbar sind. Von den letzteren sind die folgenden zu nennen: a) Steighöhenmethode [*Röntgen-Schneider*[2]), *Michaelis*[3]) usw.], b) die Methode des maximalen Blasendruckes [*G. Fano-Mayer*[4]), *F. Czapek*[5]) usw.]; c) die Methode des Tropfengewichts [*L. Morgan*[6]) usw.]; d) die Tropfenzahlmethode; e) die Methode der Adhäsionsplatten und -ringe.

Für Tropfenzahlmethode haben *E. Duclaux*[7]), *J. Traube*[8]), *O. Gruenbaum*[9]) und *Iscovesco*[10]) eine besondere Pipette konstruiert. Mit der Adhäsionsmethode haben *Searle*[11]), *Lecomte du Nouy*[12]) und *R. Brinkman-Frl. van Dam*[13]) besondere Verfahren angegeben.

Zu biologischen und klinischen Zwecken wünscht man eine einfache, leicht ausführbare Methode. Aus diesem Grunde wurde meist die Tropfenzahlmethode im biologischen Gebiete gebraucht. Die Ringmethoden (wie sie von *Lecomte du Nouy* und von *Brinkman* und *van Dam* beschrieben wurden) sind am einfachsten und haben eine ziemlich große

---

1) Siehe *Freundlich*, Kapillarchemie, 2. Aufl., 1922, S. 17.

2) *Ostwald-Luther*, Physikochem. Messung. 3. Aufl., 1910, S. 234.

3) *L. Michaelis*, Prakt. physik. Chem. 1921, S. 61.

4) *G. Fano-Mayer*, Arch. d. Fisiol. 4, 165, 1907.

5) *F. Czapek*, Über eine Methode zur direkten Bestimmung der Oberflächenspannung. Jena 1911.

6) *L. Morgan*, Journ. of the Amer. chem. Soc. **35**, 1249—1262, 1913.

7) *E. Duclaux*, Ann. de chim. et de physique 5 ser. **18**, 76, 1878.

8) *J. Traube*, Arch. f. d. ges. Physiol. **105**, 541, 1904; auch Handb. d. Biochem. Arbeitsmeth. **5**, II, 1358.

9) *O. Gruenbaum*, Trans. of the path. soc. of London **55**, 55, 1904.

10) *Iscovesco*, C. r. de la Soc. de Biol. **69**, 353, 1910.

11) *Searle*, siehe *Bayliss*, Principles of general Physiology, S. 49.

12) *Lecomte du Nouy*. Journ. of general Physiol. **1**, 621, 1919.

13) *R. Brinkman* u. *Frl. van Dam*, Münchn. med. Wochenschr., 1921, Nr. 48, S. 1550.

Genauigkeit. Als Apparate sind bei der Methode *Brinkmans* nur ein Platinringchen und eine Torsionswage von *Hartmann-Braun* nötig, welche gegenwärtig in den meisten physiologischen und klinischen Laboratorien vorhanden sind. Das angegebene Verfahren ist folgendes:

Man hängt den Platinring an das Häkchen der Torsionswage und stellt so ein, daß das Torsionsgleichgewicht erreicht ist. Die zu untersuchende Lösung wird in einem Uhrglas unter den Ring gestellt; die Wage wird arretiert und jetzt das Uhrglas unter den Ring vorsichtig mittels eines Schraubenstativs so hoch heraufgeschraubt, daß die Flüssigkeitsoberfläche die Unterseite des Ringes gerade berührt. Jetzt wird die Wage freigemacht und die Größe derjenigen Torsion bestimmt, welche den Ring gerade losreißen kann (K). Dann wird das Uhrglas heruntergeschraubt und das Gewicht des Ringes + adhärierte Flüssigkeit bestimmt (G). Die Oberflächenspannung ist dann $K-G$, dividiert durch die für jeden Ring konstante Größe L. Die Bestimmung von L erfolgt mittels einer reinen Flüssigkeit mit genau bekannter Oberflächenspannung, z. B. mittels reinen Wassers bei bestimmter Temperatur.

Die einzelne Bestimmung von $K-G$ mit dieser Ringmethode gibt genaue Übereinstimmung, aber der L-Wert des Ringes ist nicht konstant für alle Flüssigkeiten, sondern er verändert sich mit der Oberflächenspannung der zu untersuchenden Flüssigkeit. Um die absolute Oberflächenspannung einer Flüssigkeit mit dieser Methode zu messen, ist der dabei in Betracht kommende L-Wert sehr wichtig. Es würde wichtig sein, diesen L-Wert eliminieren zu können, so daß man, bei bekanntem Wasserwert des Ringchens, eine beliebige Oberflächenspannung direkt aus einer Messung berechnen könnte. So habe ich auf Veranlassung von Herrn Dr. *R. Brinkman* einige Untersuchungen zur weiteren Prüfung der Ringmethode, hier und da unter Vergleichung mit *Traube*schem Stalagmometer, ausgeführt. Von den dabei gewonnenen Resultaten möchte ich einige Punkte in folgenden drei Kapiteln mitteilen, nämlich: a) vergleichende Untersuchung der stalagmometrischen und Ringmethode, b) Eliminierung von veränderlichem „L", d. h. die Messung der Oberflächenspannung einer beliebigen Flüssigkeit mit der Ringmethode, c) die statische Oberflächenspannung einiger biologischer Flüssigkeiten.

A. Vergleichende Untersuchung der stalagmometrischen und Ringmethode.

Bei der Oberflächenspannung einer Flüssigkeit unterscheidet man zwei Arten (dynamische und statische), und bei den Meßverfahren ebenso zwei Arten, die dynamische und die statische Methode. Für reine Substanzen geben die beiden Methoden meist den gleichen Wert; dagegen zeigen sie bei einer Lösung, besonders kolloider Lösung, ziemlich großen Unterschied. Das rührt von der Adsorption der kapillaraktiven Substanzen in die Oberfläche her, und prinzipiell sollen alle Lösungen diese Erscheinung zeigen. Die kapillaraktiven Substanzen in der

Lösung sammeln sich immer mehr in die Flüssigkeitsoberfläche unter Erniedrigung der Oberflächenspannung, und Gleichgewicht entsteht, wenn die Rückdiffusion aus der Oberfläche in das Innere der Zudiffusion nach der Oberfläche die Wage hält; dann ist die statische Oberflächenspannung erreicht. Der Übergang in das statische Gleichgewicht von dem dynamischen Zustande ist bei reinem Wasser oder kristalloider Lösung so schnell, daß er praktisch kaum in Betracht kommt; aber bei kolloider Lösung geht er so langsam, daß das statische Gleichgewicht erst nach 15 bis 30 Minuten erreicht wird. Man kann die stalagmometrische Methode nicht als eine statische betrachten und muß daran denken, daß die Ausflußgeschwindigkeit aus dem Stalagmometer einen etwaigen Einfluß auf die Tropfenzahl hat, wenn die zu untersuchende Flüssigkeit spurenweise kapillaraktive Substanz enthält, wie schon *L. Berczeller*[1]) mitteilte. Beim langsamen Abtropfen gibt es eine größere Tropfenzahl, weil die kapillaraktive Substanz sich mehr in die Oberfläche des Tropfens konzentrieren kann, und der Tropfen selbst durch die Erniedrigung seiner Oberflächenspannung kleiner wird. *J. Traube* selbst hat auch seinen Stalagmometer so modifiziert, daß man die Ausflußgeschwindigkeit beliebig regulieren kann[2]). Man kann mit der Ringmethode statische und auch dynamische Messungen ausführen. Da die meisten biologischen Flüssigkeiten mehr oder weniger kolloide Substanzen enthalten, so muß man immer darauf achten, daß sie ein statisches Gleichgewicht der Oberfläche erst nach einer ziemlich langen Zeit erhalten. Wenn man etwas früher mißt, so bekommt man einen Übergangswert auf den statischen. Der Übergang von dynamischer auf statische Spannung geht am Anfang sehr schnell und später viel langsamer, wie bei allen Adsorptionserscheinungen. Die folgenden Tabellen illustrieren das oben Angeführte.

Tabelle I. Verdünnte Essigsäurelösung.

Ringmethode. Zimmertemperatur 20° C, Ringwert[3]) des Wassers 155,5 mg	
Augenblick der Bestimmung	gemessene mg
Sofort nach der Eingießung in Uhrglas . . .	144,5
	144,5
Nach 10′	144,5
	144,4
	144,5
Nach 30′	144,2
	144,3

[1]) *L. Berczeller*, Koll.-Zeitschr. **21**, 63, 1917.

[2]) *J. Traube*, diese Zeitschr. **120**, 106. 1921.

[3]) Unter „Ringwert des Wassers“ versteht man jene zum Losreißen des Ringes von der Oberfläche reinen Wassers nötige Kraft minus Ringgewicht mit adhärierter Flüssigkeit, d. h. $K - G$ des Wassers.

Wie es aus der Tabelle I erhellt, geht die Adsorptionserscheinung bei der verdünnten Essigsäurelösung so schnell vor sich, daß man keinen Unterschied des dynamischen und statischen Wertes mit der Ringmethode erkennen kann.

Tabelle II. Na-Oleatlösung.

Ringmethode. Zimmertemperatur 18° C, Ringwert des Wassers 147,1 mg

Augenblick der Messung	Konzentration der Oleatlösung			
	0,2 g in 100 ccm mg	0,01 g in 100 ccm mg	0,005 g in 100 ccm mg	0,001 g in 100 ccm mg
Sofort nach der Eingießung .	66,9	88,0	108,5	134,5
	66,5	87,1	100,0	129,5
	—	—	93,7	125,5
Nach 5'	66,5	87,1	90,0	124,5
„ 10	66,5	86,3	89,0	120,9
„ 15	—	86,2	88,0	119,3
„ 20	—	86,0	87,6	115,0
„ 25	—	—	87,3	112,8
„ 30	—	86,0	87,3	110,9
„ 35	—	—	—	110,6
„ 40	—	—	—	110,5

Tabelle III. Frisches Kaninchenserum.

Ringmethode. Zimmertemperatur 18,5° C, Ringwert des Wassers 148,0 mg

Augenblick der Messung	Nummer des Serums		
	I. mg	II. mg	III. mg
Sofort nach der Eingießung .	123,5	123,1	122,6
	123,5	122,1	122,1
Nach 10'	121,2	120,9	120,3
„ 30	119,8	119,5	119,2
„ 40	120,0	119,5	119,0
„ 60	—	—	118,6
„ 70	—	—	118,5
„ 120	—	—	118,2

Tabelle IV. Menschenharn.

Ringmethode. Zimmertemperatur 16 bis 18,5° C, Ringwert des Wassers 149,3 mg

Augenblick der Messung	Nummer des Harns			
	I. mg	II. mg	III. mg	IV. mg
Sofort nach der Eingießung .	114,5	126,9	133,0	124,3
	113,0	125,2	131,2	123,8
Nach 5'	111,5	121,5	127,0	121,5
„ 15	110,9	120,3	124,5	120,4
„ 30	110,2	119,0	123,0	119,7
„ 45	110,4	118,9	120,5	118,7
„ 60	—	—	120,4	118,7

Die drei oberen Tabellen zeigen, daß die kolloide Lösung ziemlich lange Zeit (15 bis 30 Minuten) nötig hat, um ein statisches Oberflächengleichgewicht zu erreichen. In der Tabelle II kann man ersehen, daß die konzentrierte Oleatlösung ihr Oberflächengleichgewicht schneller als die verdünnte Lösung erreicht. Auf die Adsorptionserscheinung des Serums werde ich später nochmals zurückkommen.

Bei der Ringmethode wird immer die statische Oberflächenspannung bestimmt, deshalb kann man mit diesem statischen Verfahren selbst die Anwesenheit von Spuren kapillaraktiver Substanzen deutlich erkennen, während der halbdynamische Wert der Oberflächenspannung, wie er mit dem Stalagmometer gemessen wird, dadurch ganz wenig geändert wird. Die folgenden Tabellen zeigen diese Verhältnisse.

Tabelle V. Verdünnte Essigsäurelösung.

Stalagmometer $Z_w = 53,6$			Ringmethode $G_w = 155,7$ mg		
Z_x	$\frac{Z_w}{Z_x}$	$7,3 \cdot \frac{Z_w}{Z_x}$ mg/mm	$\frac{G_x}{G_w}$	korrigierte relative Oberflächenspannung	korrigierte Oberflächenspannung dyn/cm
58,0	0,925	6,75	0,925	0,915	66,8

Z_x bezeichnet die Tropfenzahl der zu untersuchenden Flüssigkeit.
Z_w die Tropfenzahl reinen destillierten Wassers.

$7,3 \cdot \frac{Z_w}{Z_x}$ bezeichnet die Oberflächenspannung; eigentlich ist es nicht richtig, aber der Einfachheit halber habe ich spezifisches Gewicht vorläufig weggelassen und direkt mg/mm berechnet.

G_w bezeichnet gemessene Milligramm reinen Wassers; G_x gemessene Milligramm der Flüssigkeit.

Korrigierte relative und absolute Oberflächenspannung wurden nach einer Formel berechnet, welche ich im folgenden Kapitel erklären möchte.

Tabelle VI. Na-Oleatlösung (Zimmertemperatur 17,5 bis 20° C).

Konzentration Gramm in 100 ccm	Stalagmometer $Z_w = 53,5$ mg			Ringmethode $G_w = 147,1$ mg		
	Z_x	$\frac{Z_w}{Z_x}$	$7,3 \cdot \frac{Z_w}{Z_x}$ mg/mm	G_x	$\frac{G_x}{G_w}$	korrigierte Oberflächenspannung dyn/cm
2	140,3	0,381	2,78	68,4	0,465	26,9
1	145,9	367	2,68	67,5	459	26,4
0,5	148,9	359	2,62	66,8	454	26,0
0,2	149,7	358	2,61	66,5	452	25,8
0,1	144,3	371	2,71	66,4	452	25,8
0,05	139,0	385	2,81	66,0	449	25,5
0,01	56,8	942	6,88	86,3	587	37,4
0,005	54,05	990	7,23	87,3	594	38,0
0,001	53,45	1,00	7,30	110,9	754	51,8

Bemerkung. Bei dieser Bestimmung beobachtete ich, daß die Oleatlösung bei weiterer Verdünnung etwas trüb aussah. Dies rührt wahrscheinlich von einer Emulsionsbildung her; so müßte ein Teil des Oleates eine hydrolytische Spaltung erlitten haben. Dementsprechend zeigte die Oberflächenspannung der etwas verdünnten Lösung sich immer niedriger als die der Originallösung.

Tabelle VII. Verdünntes Kaninchenserum (Zimmertemperatur 13° C).

Verdünnungsgrad	Stalagmometer			Ringmethode		
	Z_x	$\frac{Z_w}{Z_x}$	$7{,}3 \cdot \frac{Z_w}{Z_x}$ mg/mm	G_x	$\frac{G_x}{G_w}$	korrigierte Oberflächenspannung dyn/cm
Originalserum	58,07	0,915	6,68	121,9	0,8318	58,5
10 fach	54,87	968	7,07	124,3	8482	59,9
100 „	53,23	998	7,29	128,9	8799	62,6
500 „	53,05	1,001	7,31	129,3	8825	62,9
1000 „	53,06	1,001	7,31	129,3	8825	62,9
10 000 „	—	—	—	142,5	9725	70,6
100 000 „	—	—	—	146,0	9965	72,7
0,85 % NaCl-Lösung .	53,13	—	—	146,5	—	—

Tabelle V zeigt, daß die beiden Methoden bei kristalloider Lösung ungefähr gleichen Wert geben. Aus Tabelle VI und VII ist zu ersehen, daß bei kolloider Lösung der stalagmometrische und statische Wert konzentrierter Lösung fast gleich sind, während der Unterschied der beiden sich immer mehr mit der Verdünnung vergrößert. Bei verdünnter Lösung gibt die stalagmometrische Methode den Wasserwert schon in solcher Konzentration, wo die Ringmethode noch ziemlich niedrigen Wert gibt. Hierbei kann man zur Vergleichung noch erinnern, daß dieser stalagmometrische Wert der konzentrierten Oleatlösung bedeutend kleiner (über zweifach) als der dynamische Wert derselben Konzentration ist, welchen *Freundlich*[1]) mittels der Methode der schwingenden Strahlen gemessen hat; d. h. die wahre dynamische Oberflächenspannung der konzentrierten Oleatlösung (1- bis 0,1 proz.) muß noch erheblich größer sein.

Schlußfolgerungen.

1. Um die statische Oberflächenspannung einer Flüssigkeit mittels der Ringmethode zu messen, muß man die zu untersuchende Flüssigkeit im Uhrglase eine Zeitlang stehenlassen; im Falle kolloider Flüssigkeit 15 bis 30 Minuten. Eine molekular disperse Lösung erhält bald ihr statisches Oberflächengleichgewicht.

2. Bei molekular disperser Lösung geben die stalagmometrische und die Ringmethode ungefähr gleiche Werte. Bei kolloider Flüssigkeit sind

[1]) *Freundlich*, Kapillarchemie, 2. Aufl., 1920, S. 56.

die Verhältnisse ganz anders: Ist der kapillaraktive Stoff konzentriert vorhanden, so geben die beiden Methoden fast gleichen Wert, dagegen zeigen sie ziemlich große Unterschiede, wenn er in verdünnter Konzentration vorhanden ist.

3. Bei sehr verdünnter kolloider Lösung gibt die stalagmometrische Methode schon den Wert des reinen Wassers, während die Ringmethode noch deutlich Anwesenheit einer kapillaraktiven Substanz angibt.

B Die Messung der Oberflächenspannung einer beliebigen Flüssigkeit mit der Ringmethode.

In der Arbeit von *R. Brinkman* ist schon angegeben worden, daß der Ring für jede Flüssigkeit einen anderen L-Wert hat. Wenn man mit (K) die Größe derjenigen Torsion der Wage, welche den Ring gerade losreißen kann, und mit (G) das Gewicht des Ringes + adhärierte Flüssigkeit bezeichnet, ist die Oberflächenspannung $K-G$, dividiert durch die für jeden Ring konstante Größe L, d. h. $\frac{K-G}{L}$. Dieser L-Wert wird ganz leicht mittels reinen Wassers bestimmt usw. Doch bleibt diese Ringkonstante L nicht immer gleich; sie verändert sich mit der Oberflächenspannung der zu untersuchenden Flüssigkeit. Wenn der Ring von der Flüssigkeitsoberfläche durch zunehmende Torsionsspannung aufgehoben wird, macht die adhärierte Flüssigkeit niemals einen einfachen Flüssigkeitszylinder, sondern zeigt einen sogenannten Randwinkel. Dieser Randwinkel verändert sich mit der Oberflächenspannung der Flüssigkeit[1]). So darf man niemals den mittels reinen Wassers bestimmten L-Wert direkt auf eine andere kapillaraktive Flüssigkeit anwenden, weil diese einen anderen Randwinkel hat. Wendet man L-Wert reinen Wassers auf eine andere kapillaraktive Flüssigkeit an, so gibt der daraus berechnete Wert keinen wahren, sondern nur einen scheinbaren Wert, welcher immer durch irgend einen Faktor korrigiert werden muß.

Diese so ausgeführte Ringmethode ist schon von Anfang an keine absolute Methode, wie die physikalische Steighöhenmethode oder die Methode der schwingenden Strahlen usw. Prinzipiell kann man nur relative Oberflächenspannungen bestimmen, und die absolute Oberflächenspannung muß immer nach dem Vergleich mit dem bekannten Werte berechnet werden. Bei den meisten biologischen Untersuchungen ist die Bestimmung dieser scheinbaren relativen Oberflächenspannung schon ausreichend. Damit wissen wir keine wirkliche Oberflächenspannung; nur ist eine vergleichende Beobachtung unter gleichen

---

[1]) *B. Weinberg*, Zeitschr. f. physik. Chem. **10**, 34; *Th. Lohnstein*, ebendaselbst S. 504.

Bedingungen gestattet. Wenn wir *ein bestimmtes Verhältnis* zwischen der gemessenen und der wirklichen relativen Oberflächenspannung finden können, so könnten wir die letztere aus der vorderen nach einer Formel ganz leicht umrechnen. Zu solchem Zwecke habe ich eine Reihe Messungen mittels der Ringmethode über einige wohlbekannte kapillaraktive Flüssigkeiten gemacht, um die gewonnenen Zahlen mit den physikalisch bekannten Zahlen zu vergleichen.

1. Äthylalkohol.

Reinen absoluten Alkohol habe ich nochmals destilliert und mit verschiedenen Mengen reinen Wassers verdünnt. Den Gehalt des Alkohols (Gewichts-Prozent) habe ich aus der Dichte, welche mittels eines 50 ccm fassenden, selbst geeichten Pyknometers gewogen und auf die erwünschte Temperatur nach *Mendelejeffs* Tabelle[1]) korrigiert wurde, in der *Fownes*schen Tabelle[2]) gesucht. Von jeder Alkohol-Wassermischung habe ich die Oberflächenspannung mit der Ringmethode bei der bestimmten Temperatur gemessen. Dieser Wert mußte zuerst auf die verschiedenen Konzentrationen, welche in der angegebenen Tabelle der Oberflächenspannung stehen, interpoliert werden. Die wahre relative Oberflächenspannung in den folgenden Tabellen (IX bis XII) habe ich von der angegebenen entsprechenden Oberflächenspannung des Wassers berechnet und mit der gemessenen in eine Tabelle zusammengestellt, um die beiden vergleichen zu können. Die Temperatur des Wägezimmers, wo ich gearbeitet habe, war 14,5 bis 15,8°C. Diese Abweichung von 15°C ist so gering, daß ich den Temperatureinfluß auf die Oberflächenspannung bei diesem Falle ruhig vernachlässigen kann.

Tabelle VIII.
Messung der Oberflächenspannung von Alkohol-Wassermischungen mit der Ringmethode.

Zimmertemperatur 14,5 bis 15,8°C, Ringwert des Wassers 135,1 mg					
Gewichtsprozent des Alkohols bei 15°C	gemessene mg	gemessene relative Oberflächenspannung	Gewichtsprozent des Alkohols bei 15°C	gemessene mg	gemessene relative Oberflächenspannung
98,17	52,4	0,3879	37,11	67,9	5027
93,13	54,0	3997	36,24	68,3	5056
88,98	55,3	4094	32,61	70,5	5220
77,09	57,8	4279	25,63	76,1	5634
76,91	57,7	4272	20,60	81,5	6034
67,60	59,4	4387	11,18	95,4	7062
58,68	61,5	4553	7,47	101,0	7540
50,91	63,0	4663	3,79	112,8	8348
43,21	65,8	4871	0	135,1	1,000
40,82	66,7	4938			

[1]) Handb. d. biol. Arbeitsmeth. Abt. I, Teil 1, S. 233.
[2]) *Landolt-Börnstein*, Physik.-chem. Tabellen, 4. Aufl.

Tabelle IX.

Vergleich mit *Pedersons* Tabelle[1]).

Gewichtsprozent des Alkohols	Nach *Pedersons* Tabelle (Die Methode der schwingenden Strahlen)		Ringmethode
	Oberflächenspannung bei 15° C	relative Oberflächenspannung (berechnet)	interpolierte relative Oberflächenspannung von den in Tabelle VIII gemessenen
98,04	22,8	0,3069	0,3882
90,97	23,8	3204	4048
81,02	24,6	3311	4218
74,93	25,5	3432	4299
50,99	27,5	3701	4662
46,11	28,1	3782	4793
37,88	30,5	4105	5004
25,63	35,0	4711	5634
9,50	50,2	6756	7278
5,79	56,7	7631	7909
0	74,3	1,000	1,000

Tabelle X.

Vergleich mit *Weinsteins* Tabelle[1]).

Gewichtsprozent des Alkohols	Nach *Weinstein* (Steighöhe in Kapillar)		Ringmethode
	Oberflächenspannung bei 15° C dyn/cm	relative Oberflächenspannung (berechnet)	interpolierte relative Oberflächenspannung von den in Tabelle VIII gemessenen
100,0	22,5	0,3117	0,3836
90	24,1	3339	4070
80	25,4	3518	4227
70	26,6	3685	4365
60	27,7	3837	4530
50	29,1	4031	4688
40	31,2	4322	4958
30	34,7	4807	5375
20	40,6	5624	6082
10	51,2	7094	7214
0	72,2	1,000	1,000

2. Essigsäurelösung.

Nach *J. Traube*[2]) habe ich Normallösung aus reiner Essigsäure durch Titration (Phenolphthalein als Indikator) hergestellt. Von dieser Stammlösung wurde n/2, n/4, n/8, n/16 Lösung weiter durch wiederholte Verdünnung mit gleicher Menge reinen destillierten Wassers bereitet. Die gemessenen Zahlen sind mit der *Traube*schen Tabelle zusammengestellt.

[1]) *Landolt-Börnstein*, Physik.-chem. Tabellen, 4. Aufl., 1912, S. 128.
[2]) *J. Traube*, Liebigs Ann. d. Chem. **265**, 27, 1891.

Tabelle XI.

Essigsäurelösung.

Konzentration der Essigsäure	Nach *Traube* bei 15°C (Kapillarmethode)		Ringmethode bei 17,5 bis 18°C	
	$rhs/2$	relative Oberflächenspannung (berechnet)	gemessene mg	relative Oberflächenspannung
n/1 Lösung . . .	6,040	0,8280	127,1	0,8430
n/2 „ . . .	6,453	8847	134,1	8895
n/4 „ . . .	6,898	9333	141,5	9385
n/8 „ . . .	7,020	9623	144,7	9599
n/16 „ . . .	7,140	9789	147,1	9757
0 „ . . .	7,295	1,000	150,8	1,000

8. Normal-Buttersäurelösung.

Aus dem *Kahlbaum*schen Präparate Normal-Buttersäure habe ich eine Normallösung (durch Titration) hergestellt und weiter mit dem Wasser bis zur n/128 Lösung verdünnt wie bei Essigsäure. Dieser Wert ist in der folgenden Tabelle mit den *Traube*schen Zahlen[1]) zusammengestellt.

Tabelle XII.

Konzentration der Buttersäure	Nach *Traube* bei 15°C (Kapillarmethode)		Ringmethode bei 18,5 bis 19°C	
	$rhs/2$	relative Oberflächenspannung (berechnet)	gemessene mg	relative Oberflächenspannung
n/1 Lösung . . .	3,307	0,4533	80,9	0,5418
n/2 „ . . .	4,082	5597	95,2	6376
n/4 „ . . .	4,887	6699	108,9	7295
n/8 „ . . .	5,612	7696	120,4	8064
n/16 „ . . .	6,274	8602	130,1	8712
n/32 „ . . .	6,705	9193	138,8	9298
n/64 „ . . .	6,991	9585	144,0	9645
n/128 „ . . .	7,127	9770	146,5	9813
0 „ . . .	7,295	1,000	149,3	1,000

In den obigen Tabellen ist nur Alkohol bei ungefähr 15°C gemessen, und die anderen beiden (Essigsäure und Normal-Buttersäure) müßten auf 15°C umgerechnet werden; dies geschieht nach der Gleichung $O_t = O_0\,[1 - r\,(t - t_0)]$[2]). Aber r des reinen Wassers und r für jede Konzentration der Lösungen sind nicht gleich; d. h. jede Lösung muß mit dem verschiedenen r-Wert korrigiert werden. Bei der relativen Oberflächenspannung kommt nur die Verschiebung von $(r_x - r_w)$ in Betracht[3]), wenn man den Ringwert reinen Wassers auch in derselben

[1]) *J. Traube*, Liebigs Ann. d. Chemie **265**, S. 30, 1891.

[2]) *H. Freundlich*, Kapillarchemie 1922, S. 103.

[3]) r_x bedeutet r-Wert der Lösung und r_w r-Wert des reinen Wassers.

Temperatur wägt. Nehme ich den r-Wert der Normal-Buttersäurelösung vorläufig zu 0,0025 gegen 0,0020 des reinen Wassers an, so bleibt diese Korrektion innerhalb $\frac{2}{1000}$ für 3 bis 4^0 Temperaturschwankungen, was ich in diesem Falle vernachlässigen könnte.

Alle relativen Zahlen sind jetzt auf der folgenden Tafel graphisch dargestellt, indem die gemessenen relativen Zahlen auf die Abszisse und die wahren relativen Zahlen auf die Ordinate genommen werden.

Bei nebenstehender Abb. 1 bemerkt man ziemlich großen Unterschied zwischen *Weinsteins* und *Pedersons* Kurve des Alkohols. Die Methoden der beiden Autoren sind auch verschieden. Nehme ich jetzt *Pedersons* Zahlen, dann stimmen sie mit den anderen *Traube*schen Zahlen für Normal-Buttersäure- und Essigsäurelösung ziemlich gut überein. Wenn man diese drei Linien betrachtet, so erkennt man eine fast gerade Linie, abgesehen von dem obersten kurzen Teil, wo sie sich wenig nach der Abszisse beugt. Solche niedrige Oberflächenspannung kommt bei den biologischen Untersuchungen äußerst selten vor. Für die praktische Verwendung habe ich eine Formel aus dem geraden Teil

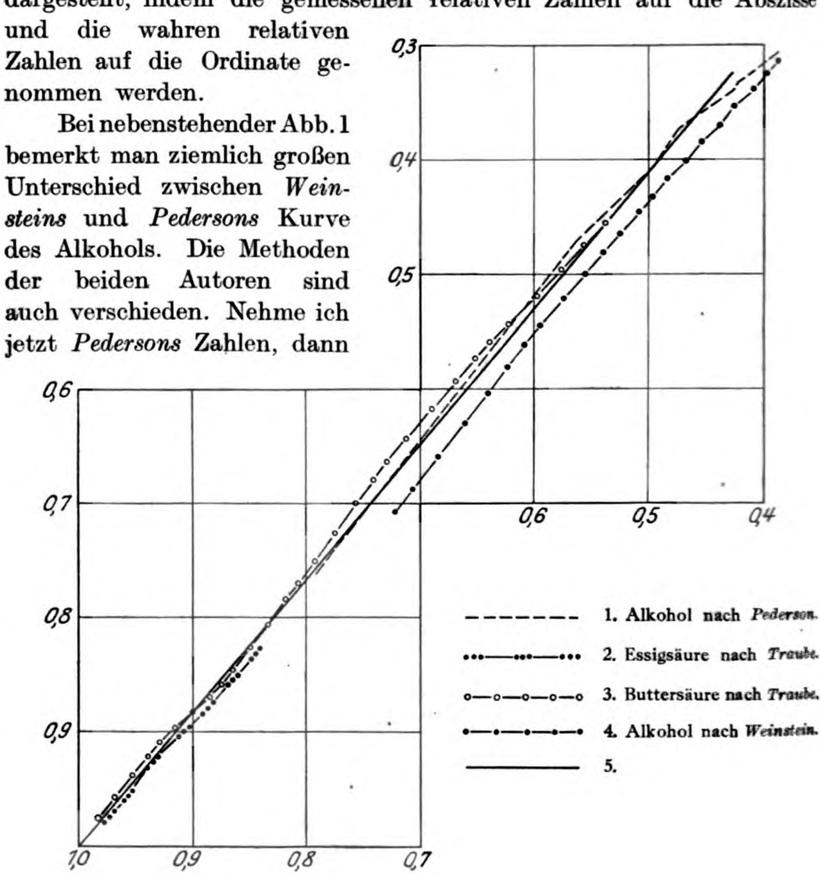


Abb. 1.

berechnet, indem ich den Ursprung (relative Oberflächenspannung 1,0 entsprechend) und den 50,99 Proz. des Alkohols entsprechenden Punkt verbinde.

Dann ist:

$$(1 - t) = K\,(1 - r).$$

Bemerkung: t zeigt den wirklichen relativen Wert bei 15 bis 18°C.

r zeigt den mittels Ringmethode gemessenen relativen Wert bei 15 bis 18°C.

K ist eine Konstante.

Wenn man die in der Tabelle stehenden Zahlen in die obere Gleichung einsetzt, dann

$$K = \frac{1 - 0{,}3701}{1 - 0{,}4662} = 1{,}18$$

$$t = 1{,}18 \times r - 0{,}18 \quad \ldots\ldots\ldots\ldots \quad (1)$$

Nach der Formel (1) habe ich den der gemessenen relativen Oberflächenspannung entsprechenden wirklichen relativen Wert berechnet und mit dem in der Literatur angegebenen in eine Tabelle zusammengestellt, um die Differenz von dem wirklichen zu betrachten.

Tabelle XIII. a) Alkohol.

Konzentration in Gewichtsprozent	Nach *Pederson*	Ringmethode		Differenz in Prozenten
	relative Oberflächenspannung bei 15°C	gemessene relative Oberflächenspannung	nach Formel (1) berechn. relative Oberflächenspannung	
98,04	0,3069	0,3882	0,2780	— 9,4
90,97	3204	4048	2978	— 7,1
81,02	3311	4218	3177	— 4,1
74,93	3432	4299	3274	— 4,6
50,99	3701	4662	3701	0
46,11	3782	4793	3857	+ 2,0
37,88	4105	5004	4104	0
25,63	4711	5634	4848	+ 2,9
9,50	6756	7278	6788	+ 0,5
5,79	7631	7909	7532	— 1,3
0	1,000	1,000	1,000	0

b) Essigsäurelösung.

Konzentration	Nach *Traube*	Ringmethode		Differenz in Prozenten
	relative Oberflächenspannung bei 15°C	gemessene relative Oberflächenspannung	nach Formel (1) berechn. relative Oberflächenspannung	
n/1 Lösung . .	0,8280	0,8430	0,8146	— 1,6
n/2 „ . .	8847	8895	870	— 1,7
n/4 „ . .	9333	9385	928	— 0,57
n/8 „ . .	9623	9599	953	— 0,9
n/16 „ . .	9787	9757	971	— 0,68
0 „ . .	1,000	1,000	1,000	0

c) Normal-Buttersäurelösung.

Konzentration	Nach *Traube*	Ringmethode		Differenz in Prozenten
	relative Oberflächenspannung bei 15° C	gemessene relative Oberflächenspannung	nach Formel (1) berechn. relative Oberflächenspannung	
n/1 Lösung . .	0,4533	0,5418	0,4593	+ 1,3
n/2 „ . .	5597	6376	5724	+ 2,2
n/4 „ . .	6699	7295	6808	+ 1,6
n/8 „ . .	7696	8064	7715	+ 0,25
n/16 „ . .	8602	8712	8480	— 1,4
n/32 „ . .	9193	9298	9170	— 0,25
n/64 „ . .	9585	9645	9580	— 0,05
n/128 „ . .	9770	9813	9780	+ 0,1
0 „ . .	1,0	1,0	1,0	0

Wie aus den Tabellen zu ersehen ist, gilt diese Formel beim 1. bis 0,35 relativen Wert der Oberflächenspannung mit 1- bis 2proz. Schwankung. Bei der noch niedriger kapillaraktiven Flüssigkeit vergrößert die Differenz sich immer mehr, bis 7 bis 9 Proz., wo man die Formel nicht mehr ohne weiteres anwenden kann. Aber nötigenfalls kann man auch hier den entsprechenden Wert auf der Kurve aussuchen.

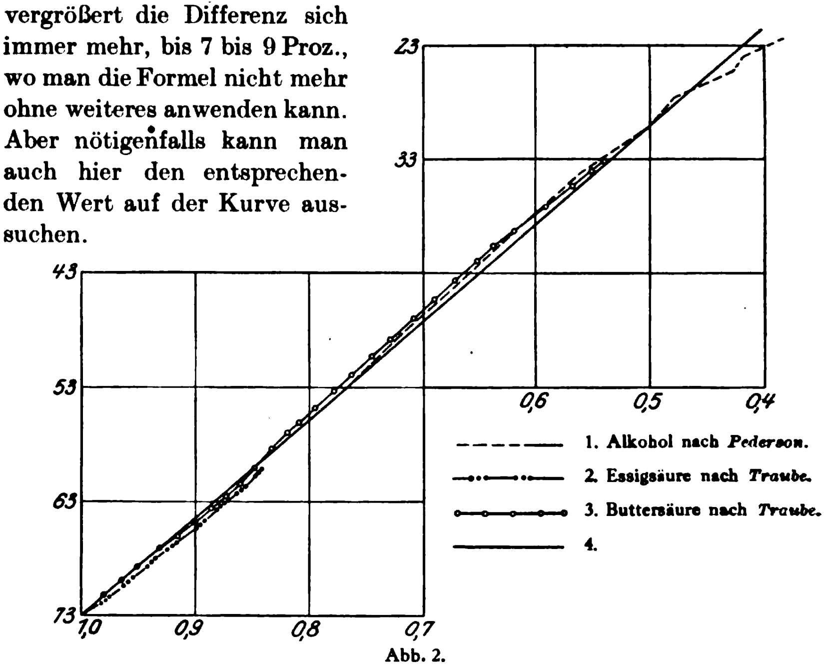


Abb. 2.

In derselben Weise, wie bei den relativen Zahlen untereinander, habe ich auch ein bestimmtes Verhältnis zwischen der gemessenen relativen Oberflächenspannung und der wahren absoluten gesucht. Die Angaben der absoluten Oberflächenspannung von verschiedenen Autoren stimmen leider nicht überein. Aber man muß selbstverständlich

immer denselben Ausgangspunkt haben, wenn man alle Zahlen in einer Kurve betrachten will. Deshalb habe ich zuerst die wirkliche absolute Oberflächenspannung aus der angegebenen relativen Oberflächenspannung umgerechnet, indem ich den absoluten Wert reinen Wassers nach *H. Freundlich*[1]) 73,0 dyn/cm bei 18°C annehme (Tabelle XIV).

Diese Tabellenzahlen habe ich wieder graphisch dargestellt. Bei dieser Kurve habe ich die gemessene relative Oberflächenspannung auf der Abszisse und die wirkliche absolute Oberflächenspannung auf der Ordinate, 1,0 der relativen Oberflächenspannung und 73 dyn/cm der absoluten, dem Ursprungspunkte entsprechend, genommen.

Die Kurve selbst sieht natürlich ganz so wie Abb. 1 aus. Es soll also heißen:

$$(73{,}0-\sigma) = K\,(1-r);$$

r zeigt die mittels Ringmethode gemessene relative Oberflächenspannung bei 15 bis 18° C.;

σ zeigt die entsprechende wirkliche absolute Oberflächenspannung bei 15 bis 18° C.;

K ist eine Konstante.

Wenn man 50,99 Proz. Alkohol entsprechende Zahlen in die Gleichung einsetzt, so

$$K = \frac{73{,}0 - 27{,}01}{1-0{,}4662} = 86{,}18$$

$$\sigma = 86{,}18 \times r - 13{,}18 \quad \ldots \ldots \quad (2)$$

Tabelle XIV.

a) Alkohol.

Nach *Pederson* 15° C		Ringmethode		Differenz in Prozenten
relative Oberflächenspannung	errechnete absolute Oberflächenspannung	gemessene relative Oberflächenspannung	nach Formel (2) berechn. absolute Oberflächenspannung	
0,3069	22,40	0,3882	20,28	— 9,3
3204	23,38	4048	21,71	— 11,4
3311	24,17	4218	23,17	— 4,1
3432	25,05	4299	23,87	— 4,7
3701	27,01	4662	27,00	— 0,004
3782	27,60	4793	28,12	+ 1,8
4105	29,96	5004	29,94	— 0,007
4711	34,39	5634	35,38	+ 2,8
6756	49,32	7278	49,53	+ 0,4
7631	55,70	7909	54,98	— 1,3
1,000	73,00	1,000	73,00	0

[1]) *H. Freundlich*, Kapillarchemie 1922. S. 32.

b) Essigsäure.

Nach *Traube* 15° C		Ringmethode		Differenz in Prozenten
relative Oberflächenspannung	errechnete absolute Oberflächenspannung	gemessene relative Oberflächenspannung	nach Formel (2) berechn. absolute Oberflächenspannung	
0,8280	60,44	0,8430	59,47	— 1,6
8847	64,57	8895	63,47	— 1,7
9333	68,13	9385	67,69	— 0,65
9623	70,25	9599	69,54	— 1,0
9789	71,45	9757	70,90	— 0,77
1,00	73,00	1,00	73,00	0

c) Normal-Buttersäure.

Nach *Traube* bei 15° C		Ringmethode		Differenz in Prozenten
relative Oberflächenspannung	errechnete absolute Oberflächenspannung	gemessene relative Oberflächenspannung	nach Formel (2) berechn. absolute Oberflächenspannung	
0,4533	33,09	0,5418	33,51	+ 1,3
5597	40,85	6376	41,76	+ 2,2
6699	48,90	7295	49,68	+ 1,6
7696	56,17	8064	56,30	+ 0,23
8602	62,79	8712	61,89	— 1,4
9193	67,10	9298	66,95	— 0,22
9585	69,97	9645	69,94	— 0,04
9770	71,32	9813	71,37	+ 0,07
1,00	73,00	1,00	73,00	0

Die nach der Formel (2) berechneten absoluten Zahlen sind in der Tabelle XIV zusammengestellt, wo man auch die Differenzen von den wirklichen Werten ersehen kann.

Soviel ich aus den Tabellen und der Kurve ersehen kann, gilt diese Formel von 73,0 — 27 dyn/cm. Bei der stark kapillaraktiven Flüssigkeit ist man genötigt, die gemessene Zahl nach der Kurve selbst korrigieren zu müssen.

Zur Kontrolle der oben geschriebenen Verhältnisse wurde noch die Oberflächenspannung einiger bekannter Flüssigkeiten untersucht. Um zu untersuchen, ob die Formel auch bei kapillarinaktiven Flüssigkeiten gilt, habe ich eine Reihe Bestimmungen über Natriumchloridlösung von verschiedenen Konzentrationen gemacht und das Resultat mit *Heydweiller*schen Zahlen[1]) in der folgende Tabelle zusammengestellt.

Reines Kochsalz (*Kahlbaum*) habe ich zuerst im Tiegel geglüht, im Exsikkator abgekühlt und ein in der *Heydweiller*schen Tabelle angegebenen Molzahl entsprechendes Grammgewicht im Meßkolben gelöst. Die Lösungen enthielten keine kapillaraktive Substanz, denn sie zeigten keine Erniedrigung beim Stehenlassen.

[1]) *Heydweiller*, Ann. d. Phys. (4), 33, 154, 1910; auch zitiert von *Freundlich*, Kapillarchemie, 2. Aufl., 1922, S. 78.

Tabelle XV.

Na-Chloridlösung.

Nach *Heydweiller* (Steighöhenmethode)		Ringmethode (bei 17,5 bis 19° C)			Differenz in Prozenten
Konzentration (Molekül i. Liter)	dyn/cm bei 18° C	gemessene relative Oberflächenspannung	korrigierte relative Oberflächenspannung	korrigierte absolute dyn/cm	
$\frac{1}{\infty}$	73,00	1,000	1,000	73,0	0
0,290	73,44	1,005	1,006	73,35	— 0,03
0,544	73,81	1,009	1,011	73,76	— 0,07
0,713	74,19	1,013	1,035	74,12	— 0,09
1,11	74,77	1,019	1,023	74,64	— 0,17
2,06	76,34	1,040	1,047	76,46	— 0,16
3,04	78,42	1,062	1,079	78,31	— 0,14
4,00	79,86	1,104	1,123	81,96	+ 2,5
5,43	82,87	1,145	1,171	85,48	+ 3,1

Aus der Tabelle erhellt, daß die erwähnte empirische Formel auch bei dieser Salzlösung gut stimmt. Aber man kann darin bemerken, daß die sehr konzentrierte Kochsalzlösung einen etwas höheren Wert gibt. Da die 5,43-Mol-Lösung bei 18° C fast gesättigt ist, scheiden die feinen Kristalle sich schnell beim Messen aus und kleben sich an den Ring. Aus diesem Grunde darf man sie eigentlich nicht als den richtigen Wert betrachten, ja sogar muß es aus der Tabelle eliminiert werden. Sonst stimmt es sehr gut.

Kontrolle an chemisch reinen Substanzen.

Weiter habe ich diese Ringmethode auf die Messung der Oberflächenspannung einiger chemisch reinen flüssigen Substanzen angewandt und mit der mittels anderer exakten Methoden bestimmten Oberflächenspannung verglichen.

Tabelle XVI.

Substanz	Ringmethode		Angegebene Oberflächenspannung		Beobachter und andere Bemerkungen
	dyn/cm	Temp. bei Messung ° C	dyn/cm	Temperatur ° C	
Benzol	29,33	17	29,16	17,5	*Volkmann*[1]) Steighöhe
Aceton	23,15	18	23,35	16,8	*Ramsay*[1]) Steighöhe
Pyridin . . .	38,29	15	38,40	17	*Ramsay* „
N-Buttersäure	26,88	15	26,74	15	*Ramsay* „
Propionsäure .	26,90	17,5	26,57	16,6	*Ramsay* „
Äthyläther . .	16,30	18	16,5	20	*Ramsay*[2]) „

[1]) *Landolt-Börnstein*, Physik.-chem. Tabellen.
[2]) *Freundlich*, Kapillarchemie, 2. Aufl., 1922, S. 38.

Aus der Tabelle kann man ersehen, daß die korrigierte Oberflächenspannung der untersuchten chemisch reinen Substanzen mit der aus der Literatur bekannten gut übereinstimmt. Dies ist auch ein Beweis für allgemeine Gültigkeit unserer empirischen Formel.

Schlußfolgerungen.

1. Bei der Ringmethode findet man empirisch ein bestimmtes Verhältnis zwischen gemessenen relativen und wirklichen relativen bzw. absoluten Oberflächenspannungen. Aus der gemessenen relativen Oberflächenspannung einer beliebigen Flüssigkeit läßt die entsprechende wirkliche relative bzw. absolute Oberflächenspannung sich nach den empirischen Formeln $t = 1{,}18 \times r - 0{,}18$ bzw. $\sigma = 86{,}18 \times r - 13{,}18$ *dyn/cm berechnen.*

2. Das Resultat der Messungen einiger chemisch reinen kapillaraktiven Substanzen stimmt mit dem aus der Literatur bekannten Wert sehr gut überein.

3. Diese empirische Formel gilt auch für kapillarinaktive Flüssigkeiten.

4. Zwischen 78 — 27 dyn/cm zeigt die empirische Kurve eine fast gerade Linie; da die sehr stark erniedrigte Oberflächenspannung in biologischen Flüssigkeiten ganz selten vorkommt, so kann man gewöhnlich diese einfache Ringmethode mit der angegebenen Korrektion ganz exakt anwenden.

C. Bestimmung der Oberflächenspannung von einigen biologischen Flüssigkeiten.

1. Bestimmung der Oberflächenspannung des Serums.

Die Oberflächenspannung des Blutserums ist schon mehrmals angegeben worden, aber ziemlich verschieden, je nach der angewandten Methode.

Mit dem Stalagmometer haben *J. Traube*[1]), *Kisch-Remertz*[2]), *Kascher*[3]), *Iscovesco*[4]), *Kunoff*[5]), *F. Boenheim*[6]) die Oberflächenspannung des Serums der gesunden Menschen gemessen: Sie geben an: nach *Traube* 6,42; nach *Kisch* 6,4 bis 6,5; nach *Kascher* 6,43 bis 6,5; nach *Kunoff* 6,6; nach *Boenheim* 6,4 bis 6,7 mg/mm; nach *Iscovesco* 69,97 bis 70,12 dyn/cm bei Zimmertemperatur.

Mit der Blasendruckmethode geben *Fano-Mayer*[7]) die Oberflächenspannung des normalen Menschenserums als 58,2 bis 59,9 dyn/cm bei 39°C an. Mit der Tropfengewichtsmethode haben *Morgan* und *Woodward*[8]) 44,3 bis 46,4 dyn/cm bei 37°C für das menschliche Serum angegeben. Mit dem Tensimeter (Ringmethode) gibt *Du Nouy*[9]) 55,5 bis 55,6 dyn/cm

---

[1]) *J. Traube*, Intern. Zeitschr. f. physik.-chem. Biol. **1**, 389, 1914.

[2]) *Kisch* und *Remertz*, ebendaselbst **1**, 354, 1914.

[3]) *Kascher*, Diss., Berlin 1907.

[4]) *Iscovesco*, C. r. de la Soc. de Biol. **70**, 66, 1911; s. auch *Neuberg*, Der Harn **2**, 1727.

[5]) *Kunoff*, Diss., Berlin 1907.

[6]) *F. Boenheim*, diese Zeitschr. **94**, 174, 1919.

[7]) *Fano-Mayer*, Arch. di fisiol. **4**, 165, 1907; s. auch *Neuberg*, Der Harn **2**, 1726.

[8]) *Morgan* and *Woodward*, Journ. of Amer. chem. Soc. **35**, 1249—1262, 1913.

[9]) *Du Nouy*, Journ. of exper. Med. **35**, 575—597, 1922.

bei 25°C für das Hundeserum an. Mit der Ringmethode gibt *R. Brinkman*[1]) 55,4 bis 57,2 dyn/cm bei ± 20°C für das menschliche Oxalatplasma an.

Mit unserer Ringmethode habe ich auch die Oberflächenspannung des Kaninchenserums gemessen. Wie es schon von *Traube* und anderen Autoren angegeben wird, muß man dabei hämoglobinhaltiges Serum peinlichst vermeiden und immer frisches Serum untersuchen. Da ich von dem Serum langsame Adsorption in die Oberfläche erwarten konnte, so habe ich die Oberflächenspannung im fortlaufenden Zeitabschnitt gemessen.

Aus der Tabelle XVII kann man ersehen, daß die Adsorption an die Oberfläche unter Erniedrigung der Oberflächenspannung am Anfang ziemlich schnell, dagegen später sehr langsam vor sich geht. Die Erniedrigung der Oberflächenspannung in den ersten 5 Minuten ist oberhalb 2 dyn/cm, während diejenige in den zweiten 10 Minuten unterhalb 0,5 dyn/cm bleibt. Die Erniedrigung der Oberflächenspannung sistiert sich nach einer Stunde noch nicht, sondern schreitet weiter fort. Diese Erniedrigung rührt wahrscheinlich von der fortschreitenden Adsorption der kapillaraktiven Substanzen in die Oberfläche her; aber man muß daran denken, daß ein Teil der Erniedrigung auch von der chemischen Veränderung an der Oberfläche oder in der Flüssigkeit verursacht werden kann, wenn man die Flüssigkeit mehrere Stunden lang stehenläßt. Welchen Anteil auf die Oberflächenspannungserniedrigung diese chemische Veränderung hat, bleibt noch ganz offen. Jedenfalls nach 30 bis 45 Minuten erreicht die Oberflächenspannung ungefähr ein Gleichgewicht, wenigstens verläuft die Adsorption weiter sehr langsam. Praktisch habe ich also die Spannung nach 30 Minuten als die statische bei dieser Messung betrachtet, obwohl *Du Nouy*[2]) angibt, daß die Oberflächenspannung bei seiner Messung praktisch eine Konstanz nach 10 Minuten erreichen kann. Selbstverständlich hat die Temperatur des Zimmers auch einen Einfluß auf die Schnelligkeit der Adsorption, und er hat bei 23 bis 25°C gemessen, während die Temperatur bei meiner Messung etwas niedriger war.

In der Tabelle bemerkt man, daß der Anfangswert ziemlich starke Schwankungen zeigt. In dem ersten Augenblick ganz pünktlich zu messen, ist sehr schwer, ja sogar fast unmöglich; und gerade in diesem Zeitabschnitt verläuft die Adsorption an die Oberfläche (Oberflächenspannungserniedrigung) sehr schnell, was die Ursache der Schwankung des Anfangswertes sein soll. Deshalb hat *Du Nouy* diesen Anfangswert nach seiner Formel berechnet. Die Oberflächenspannung des normalen frischen Kaninchenserums mit unserer Ringmethode ist 56,2 bis 58,5 dyn/cm bei Zimmertemperatur. Wenn man die bei 16 bis 18°C

[1]) *R. Brinkman*, Arch. Néerlandais. de Physiol. de l'Homme et des Animaux 7, 258, 1922.

[2]) *Du Nouy*. Journ. of exper. Med. 35, 575—597, 1912.

Tabelle XVII. Kaninchenserum.

	I.		II.		III.		IV.		V.		VI.		VII.		VIII.		IX.	
	Ringwert 147,6 mg Zimmertemperatur 12° C		Ringwert 147,5 mg Zimmertemperatur 15° C		Ringwert 147,5 mg Zimmertemperatur 16° C		Ringwert 147,6 mg Zimmertemperatur 12,5° C		Ringwert 148,0 mg Zimmertemperatur 18,5° C		Ringwert 148,0 mg Zimmertemperatur 14,5° C		Ringwert 148,0 mg Zimmertemperatur 17° C		Ringwert 148,0 mg Zimmertemperatur 16° C		Ringwert 148,0 mg Zimmertemperatur 16° C	
	gemess. mg	korrig. dyn/cm	gemess. mg	korrig. dyn/cm	gemess. mg	korrig. dyn/cm	gemess. mg	korrig. dyn/cm	gemess. mg	korrig. dyn/cm	gemess. mg	korrig. dyn/cm	gemess. mg	korrig. dyn/cm	gemess. mg	korrig. dyn/cm	gemess. mg	korrig. dyn/cm
Direkt n. Eingieß.	—	—	127,5	61,3	127,0	61,0	129,0	62,1	122,6	58,2	125,6	60,0	125,0	59,6	126,0	60,2	123,7	58,8
	125,3	60,0	125,0	59,9	123,0	58,7	125,4	60,0	122,1	57,9	124,3	59,3	124,0	59,0	124,0	59,0	121,9	57,7
5′	122,5	58,3	124,0	59,3	122,9	58,6	123,7	59,0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
10	—	—	—	—	—	—	—	—	120,3	56,9	122,5	58,1	122,5	58,1	121,3	57,4	121,7	57,7
15	122,5	58,3	123,0	58,7	122,1	58,2	122,3	58,2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
30	121,9	58,0	122,6	58,5	121,7	57,8	122,3	58,2	119,2	56,2	121,3	57,4	121,5	57,6	120,7	57,1	120,4	57,0
45	122,1	58,1	122,6	58,5	121,7	57,8	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
60	121,0	57,5	—	—	121,0	57,5	121,6	57,8	118,6	55,9	—	—	120,7	57,1	—	—	—	—
75	—	—	—	—	121,0	57,5	—	—	118,5	55,8	—	—	—	—	—	—	—	—
90	—	—	120,5	57,2	129,9	57,4	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
2h	119,5	56,6	—	—	—	—	—	—	118,2	55,7	—	—	—	—	—	—	—	—
3	—	—	—	—	119,0	56,3	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
4	—	—	117,9	55,7	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
5	—	—	—	—	116,8	55,1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
20	—	—	—	—	—	—	118,5	56,0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
23	115,5	54,3	109,6	50,9	108,5	50,2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
29	—	—	108,3	50,1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
47	—	—	111,0	51,7	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

gemessenen aus der Tabelle auswählt, dann ist sie 57,0 bis 58,5 dyn/cm, durchschnittlich 57,6 dyn/cm. Diese Zahl ist etwas größer als die von *Du Nouy* angegebene für Kaninchenserum [55,5 dyn/cm nach 15 Minuten[1])]. *Du Nouy* hat den Wasserwert als 77 dyn/cm bei 25° C berechnet und mit seinem besonderen Tensimeter gemessen, dagegen haben wir den Wasserwert als 73 dyn/cm bei 18° C betrachtet und nach einer empirischen Formel unter Berücksichtigung des Randwinkels umrechnet. Dazu fanden meine Messungen bei 16 bis 18° C statt, während *Du Nouy* bei 23° C gemessen hatte.

Morgan und *Woodward* geben 45,2 bis 47,5 dyn/cm bei 37° C für Kaninchenserum an. Dies ist ziemlich niedrig; die gebrauchte Methode war eine ganz andere. Zur Vergleichung habe ich auch einige Messungen bei 37° C gemacht. Ein Teil des frischen Kaninchenserums wurde direkt bei Zimmertemperatur gemessen und ein anderer Teil im Brutschrank auf 37° C in einem kleinen Zylinder mit Glasstöpsel erwärmt und erst nach einer Stunde bei 37° C gemessen. Der Ringwert des reinen Wassers bei 37° C war durchschnittlich 144,5 mg. Von der korrigierten relativen Oberflächenspannung habe ich die absolute Oberflächenspannung durch Multiplikation von 70,27 dyn/cm berechnet, indem ich die Oberflächenspannung des Wassers bei 37° C nach der Gleichung $\sigma_t = \sigma \cdot (1 - r \cdot t)$ ausrechnete ($r = 0{,}0020$).

Methode: Auf den Brutschrank setzt man die Torsionswage, dagegen in denselben ein Schraubenstativ, auf welchem das die Flüssigkeit enthaltende Uhrglas gestellt worden ist. Durch ein oberes Loch des Brutschrankes wird der Platinring mittels eines feinen Drahtes an das Häkchen der Wage gehängt. In dieser Weise kann man die Oberflächenspannung bei beliebiger Temperatur messen.

Tabelle XVIII. Kaninchenserum bei 37° C.

	I. Ringwert bei 37° C 144,5 mg			II. Ringwert bei 37° C 144,5 mg		
	gemessene mg	korrigierte relative Oberflächenspannung	dyn/cm	gemessene mg	korrigierte relative Oberflächenspannung	dyn/cm
Sofort n. Eingießung	119,3	0,7940	55,8	120,2	0,8015	56,3
	—	—	—	116,4	7707	54,1
5'	116,0	7675	53,9	115,4	7623	53,5
10	115,0	7590	53,3	114,0	7510	52,7
15	114,5	7550	53,0	113,0	7429	52,2
30	110,5	7223	50,7	107,5	6980	49,0
45	107,0	6939	48,7	105,2	6790	47,7
60	105,0	6774	47,6	105,3	6798	47,7
75	104,5	6734	47,3	104,8	6756	47,4
90	104,5	6734	47,3	105,3	6798	47,7
105	104,5	6734	47,3	105,3	6798	47,7
120	104,7	6748	47,4	105,5	6818	47,9

[1]) *Du Nouy*, Journ. of. exper. Med. **35**, 582, 1922.

Aus der Tabelle kann man ersehen, daß die Oberflächenspannung nach 60 Minuten einen fast konstanten Wert zeigt, während die Erniedrigung der Oberflächenspannung bei Zimmertemperatur über 24 Stunden dauerte. Die konstante statische Oberflächenspannung bei 37° C beträgt 47,3 bis 47,4 dyn/cm, welcher Wert mit den von *Morgan Woodward* angegebenen Zahlen ziemlich gut übereinstimmt. Die niedrigste Oberflächenspannung bei Zimmertemperatur nach etwa 30 Stunden ist auch ungefähr 49,3 dyn/cm.

Die Angaben von mehreren Beobachtern, die mit dem *Traube*schen Stalagmometer gearbeitet haben, stimmen untereinander gut überein; aber die angegebenen Zahlen sind bedeutend größer als die mit anderen statischen Methoden gemessenen. Das kann man wohl begreifen, weil das Serum eine kolloide Flüssigkeit ist. Wegen der Vergleichung mit unserer Ringmethode habe ich auch einige stalagmometrische Bestimmungen von denselben frischen Kaninchensera gemacht.

Tabelle XIX.
Kaninchenserum.

Nr. des Serums	Stalagmometer $Z_w = 53{,}6$ mg			Ringmethode $G_w = 148{,}0$ mg		Temperatur bei Messungen °C
	Z_x	$\frac{Z_w}{Z_x}$	$7{,}3 \cdot d \cdot \frac{Z_w}{Z_x}$ mg/mm	gemessene mg nach 30′	dyn/cm	
1	58,56	0,916	6,87	121,5	57,6	17
2	58,48	917	6,88	121,3	57,4	14,5
3	58,96	909	6,82	120,7	57,1	16

Bemerkung. Das spezifische Gewicht wurde nicht gemessen; vorläufig habe ich als 1028 berechnet.

Meine stalagmometrische Zahl stimmt auch mit der von *Kascher*[1]) für Kaninchenserum angegebenen (6,46 bis 6,68 mg/mm bei Zimmertemperatur) annähernd überein und ist ungefähr 10 dyn/cm höher als der statische Ringwert, weil der Stalagmometer einen bei kolloider Flüssigkeit halb dynamischen Wert angibt.

2. Bestimmung der Oberflächenspannung des Harns.

Die Oberflächenspannung des normalen und pathologischen Harns ist von *Frenkel* und *Cluzet*[2]), *J. Amann*[3]), *W. D. Donnan* und *F. G. Donnan*[4]), *Posner*[5]) und anderen bestimmt worden. *Frenkel* und *Cluzet* fanden sie mittels Steighöhenmethode etwa 10 bis 20 dyn/cm niedriger als die des Wassers, und die anderen Autoren haben weiter noch angegeben, daß die

1) *Kascher*, l. c.
2) *Frenkel* und *Cluzet*, Journ. de Phys. et de Path. gener. **3**, **99**, **1901**.
3) *J. Amann*, Bull. soc. Vandoise **38**, 131.
4) *D. Donnan* und *G. Donnan*, British med. Journ. **1905**, S. **1923**; ältere Literaturangaben zitiert in *Neuberg*, Der Harn **2**, **1735**.
5) *Posner*, Berl. klin. Wochenschr. **53**, 1916.

Oberflächenspannung des konzentrierten Urins niedriger als die des verdünnten ist. So hat *Schemensky*[1]) die Tropfenzahl beim gleichen spezifischen Gewicht (1010) und der gleichen H'-Ionenkonzentration (Methylorange von Gelb in Orange und Kongorot von Rot in Hellblau) stalagmometrisch gemessen und einen stalagmometrischen Quotienten angegeben, indem er die so gemessene Tropfenzahl durch die nach der Behandlung mit Tierkohle gemessene Tropfenzahl dividiert. Über die Zusammensetzung des kapillaraktiven Stoffes des normalen Harns weiß man noch nichts Genaues. *H. Bechhold* und *L. Reiner*[2]) geben an, daß die Erniedrigung meist von Eiweißschlacken wie Albumosen, Peptonen, Oxyproteinsäuren verursacht wird. Jedenfalls scheinen sie sicher von kolloider Natur zu sein.

Die langsame Adsorption bei der Messung mit unserer Ringmethode entspricht dem auch, wie ich es schon in Tabelle IV gezeigt habe. Aber diese Adsorption in die Oberfläche (Oberflächenspannungserniedrigung) dauert nicht so lange Zeit, wie es beim Serum der Fall ist. In den meisten Fällen erreicht der Harn (normaler menschlicher) nach 45 bis 60 Minuten sein Oberflächengleichgewicht. Durch die kolloide Natur der fraglichen Substanzen kann man erwarten, daß der stalagmometrische Wert höher als der statische Ringwert sein würde, wie ich vorher an einer Oleatlösung erläutert habe. Dies illustriert die folgende Tabelle, in welcher normaler menschlicher Harn vergleichend gemessen wurde.

Tabelle XX.
Menschlicher Harn.

Nr. des Harns	Spez. Gewicht	Stalagmometrisch		Ringmethode		Bemerkungen
		$\frac{Z_w}{Z_x}$	$7{,}3 \cdot d \cdot \frac{Z_w}{Z_x}$ mg/mm	gemessene relative Oberflächenspannung	korrig. dyn/cm	
1	1019	0,884	6,58	0,796	55,4	Zimmertemperatur 15,5° C, 24 std. Harn, Reaktion sauer
2	1024	848	6,34	775	53,6	Zimmertemperatur 17° C, 24 std. Harn, Reaktion sauer
3	1016	920	6,82	819	57,4	Zimmertemperatur 15,5° C, 24 std. Harn, Reaktion sauer
4	1015	897	6,65	823	57,8	Zimmertemperatur 16° C, 24 std. Harn, Reaktion sauer
5	1019	—	—	0,738	50,4	Zimmertemperatur 17° C, einmaliger Harn sauer
6	1019	—	—	796	55,5	Zimmertemperatur 15,5° C, einmaliger Harn sauer
7	1010	—	—	840	59,2	Zimmertemperatur 15,5° C, einmaliger Harn sauer
8	1010	—	—	807	57,0	Zimmertemperatur 17° C, einmaliger Harn sauer
9	1012	—	—	806	56,2	Zimmertemperatur 17° C, einmaliger Harn sauer
10	1020	—	—	762	52,5	Zimmertemperatur 17° C, einmaliger Harn sauer
11	1026	—	—	744	51,0	Zimmertemperatur 18,5° C, einmaliger Harn sauer
12	1027	—	—	789	54,8	Zimmertemperatur 20° C, einmaliger Harn sauer

[1]) *Schemensky*, diese Zeitschr. **105**, 229, 1920.
[2]) *H. Bechhold* und *L. Reiner*, ebendaselbst **108**, 98. 1920

Die obige Tabelle zeigt, daß die Oberflächenspannungserniedrigung des normalen menschlichen Harns vom spezifischen Gewicht abhängig, aber ihm nicht streng parallel ist. Der stalagmometrische Wert ist ungefähr 10 dyn/cm höher als der statische Ringwert, welch letzterer von 50,4 bis 59,2 dyn/cm je nach der Konzentration des Harns schwankt; doch ist er meist dem des Serums fast gleich oder etwas kleiner. Der Unterschied mit den beiden Methoden ist auch ganz so wie beim Serum.

3. *Bestimmung der Oberflächenspannung des Kammerwassers.*

Bardier und *Cluzet*[1]) haben zuerst die Oberflächenspannung des Kammerwassers stalagmometrisch gemessen und angegeben, daß sie fast Wasserwert zeigt; aber *van Creveld*[2]) gibt mit unserer Ringmethode an, daß sie nur um ein paar Dyn/Zentimeter höher als die des betreffenden Serums ist. Um die zeitlichen Verhältnisse zu beobachten, habe ich auch einige Messungen gemacht. Die Punktion der Augenkammer habe ich in derselben Weise ausgeführt, wie sie früher von *J. de Haan* und *S. van Creveld*[3]) gemacht wurde.

Tabelle XXI. Kammerwasser des Kaninchens.

	I.		II.		III.		IV.		V.	
	dyn/cm Zimmertemperatur 21,5° C		dyn/cm Zimmertemperatur 21,5° C		dyn/cm Zimmertemperatur 21° C		dyn/cm Zimmertemperatur 19° C		dyn/cm Zimmertemperatur 15° C	
	rechts	links	rechts	links	rechts	links	rechts	links	rechts	links
Sofort n. Eingießung	62,9	—	60,2	61,1	64,1	63,5	61,6	60,1	63,6	62,5
5'	61,4	—	59,1	59,9	62,4	—	59,7	58,8	63,1	62,0
15	60,1	—	59,0	59,3	61,4	59,3	58,5	58,1	63,3	62,5
30	60,9	—	58,7	59,3	62,0	59,3	58,6	58,0	62,5	—

In der obigen Tabelle kann man ersehen, daß die Oberflächenspannung meist nach 15 Minuten eine Konstanz erreicht und im weiteren Zeitabschnitt sich ab und zu erhöht. Wahrscheinlich rührt es von der minimalen Menge der kapillaraktiven Substanz her, weil ein Teil der letzteren, welcher an dem Platinring haftet, bei jeder Messung verloren geht. Der Fall V zeigt relativ höheren Wert als die anderen, was die Folge der niederen Temperatur bei der Messung sein würde. Die statische Oberflächenspannung des Kammerwassers bei Zimmertemperatur zeigt 58 bis 61 dyn/cm, d. h. 1 bis 3 dyn/cm höher als die des Serums.

---

[1]) *Bardier* und *Cluzet*, C. r. de la Soc. de Biol. **54**, 119, 1902.

[2]) *S. van Creveld*, Monatsschr. f. Augenheilk., Okt. 1922, erscheint ausführlicher in Arch. Néerl. de Physiol.

[3]) *J. de Haan* und *S. van Creveld*, Koninklyke Akademie van Wetenschappen te Amsterdam **23**, Nr. 9, S. 1347, 1921.

Schlußfolgerungen.

1. Beim Messen der Oberflächenspannung des Serums mit der Ringmethode muß man immer auf die Adsorptionserscheinung achten. Nach 30 Minuten erreicht das Serum praktisch Oberflächengleichgewicht; aber man bekommt immer niedrigere Werte, wenn man die zu untersuchende Flüssigkeit im Uhrglase noch weiter mehrere Stunden stehen läßt. Man soll also immer auf diesen Zeitablauf achten.

2. Die Oberflächenspannung des normalen Kaninchenserums, mit unserer Ringmethode bestimmt, ist 57 bis 58,5 dyn/cm, durchschnittlich 57,6 dyn/cm bei Zimmertemperatur.

3. Die Oberflächenspannung des Serums bei 37°C ist bedeutend niedriger (ungefähr 10 dyn/cm) als diejenige bei Zimmertemperatur und beträgt 47,3 bis 47,4 dyn/cm. Dies stimmt mit *Morgans* Angabe, die nach der Tropfengewichtsmethode erhalten wurde, annähernd überein.

4. Der stalagmometrische Wert des Serums ist etwa 10 dyn/cm höher als der statische.

5. Die Oberflächenspannung des normalen Harns erreicht in kürzerer Zeit als beim Serum ihre maximale Erniedrigung, meistens nach einer Stunde; aber praktisch kann man die nach 30 Minuten gemessene als die statische Oberflächenspannung betrachten, weil sie sich im weiteren Zeitablauf sehr wenig erniedrigt. Sie schwankt auch im relativ breiten Umfang je nach dem spezifischen Gewicht; doch bleibt sie meist unterhalb des Serumwertes.

6. Der stalagmometrische Wert des Harns ist ungefähr 10 dyn/cm höher als der statische Ringwert.

7. Die Oberflächenspannungserniedrigung des Kammerwassers erreicht nach 15 bis 30 Minuten ihr Maximum.

8. Die statische Oberflächenspannung des Kammerwassers mit der Ringmethode ist 58 bis 61 dyn/cm, d. h. 1 bis 3 dyn/cm höher als die des Serums.

Zum Schluß halte ich es für meine angenehme Pflicht, Herrn Prof. *Hamburger* und Dr. *R. Brinkman* meinen verbindlichen Dank für ihre freundlichen Ratschläge und Hilfe auszusprechen.

Über die Alkalireserve des Blutplasmas bei Avitaminose.

Von

J. A. Collazo (Montevideo).

(Aus der experimentell-biologischen Abteilung des pathologischen Instituts der Universität Berlin.)

(Eingegangen am 11. Juni 1923.)

In einer Arbeit von *Hagashi*[1]), die mir nur auszugsweise zugänglich war, wird mitgeteilt, daß bei beriberikranken Menschen die Blutalkaleszenz, d. h. das Kohlensäurebindungsvermögen, herabgesetzt sei. Bei 24 gesunden Menschen wurden Werte zwischen 53,5 und 70,0 % gefunden, bei 21 dieser Personen lagen die Werte zwischen 55 und 67 %. Bei 82 beriberikranken Individuen wurden folgende Zahlen für das Kohlensäurebindungsvermögen ermittelt:

bei	2	Patienten	30 %
,,	4	,,	30 bis 40 %
,,	23	,,	40 bis 50 %
,,	16	,,	50 bis 55 %
,,	37	,,	55 % und mehr.

Im ganzen schwankten die Zahlen bei den 82 Fällen von Beriberi zwischen 30,5 und 71,8 %.

Angesichts dieser Mitteilungen mußte man sich die Frage vorlegen, ob die bei Beriberikranken in nicht einmal der Hälfte der untersuchten Fälle beobachtete Herabsetzung der Blutalkaleszenz eine für den Verlauf der Beriberi charakteristische Erscheinung sei, oder ob sie nur ein gelegentliches Ereignis, etwa eine zufällige und individuell verschiedene Komplikation dieser Krankheit darstelle, oder gar nur der Ausdruck für einen in manchen Fällen vorhandenen einfachen Hungerzustand sei.

Ich habe daher bei Hunden, Meerschweinchen und Tauben, die ich mit vitaminfreier Nahrung fütterte, fortlaufend nach der *van Slyke*schen Methode[2]) das CO_2-Bindungsvermögen des Blutes untersucht; natürlich wurde diese Untersuchung auch mehrmals bei jedem Tiere vorgenommen, als es sich in der Vorperiode noch bei normaler Fütterung befand.

---

[1]) Japan. med. Wochenschrift 1922 (japanisch).

[2]) *van Slyke* und *Cullen*, Journ. of biol. Chem. **30**, 316; *Ph. Hawk*, Protical Physiological chemistry, Philadelphia. 6. ed., 1919, S. 325; *Pincussen*, Mikromethodik, 2. Aufl., S. 114. Berlin 1923.

Ich machte diese Experimente an drei Hunden, von denen der erste Mitte der 7. Woche, der zweite in der 12. Woche und der dritte in der 16. Woche der avitaminösen Fütterung starb. Ferner experimentierte ich an einem Hungerhunde, der nach einer voraufgehenden Normalernährung 25 Tage hungerte, eine Zeit, in der er aber täglich Wasser und 3 g Salzgemisch bekam, das auch die avitaminös ernährten Tiere täglich erhielten. Das Salzgemisch bestand aus: Natrium chlorat. 250 g, Calcium lactic. 100 g, Magnesium citric. 100 g, Ferri citric. 25 g. Auf diese täglich gleichartige Salzzulage bei allen Versuchstieren ist großes Gewicht zu legen, daß die zur Beobachtung gelangenden Alkaleszenzveränderungen des Blutes nicht etwa auf einen Mangel an anorganischen Nahrungsbestandteilen bezogen werden können. Ferner arbeitete ich an vier Meerschweinchen und an sechs Tauben, die alle ebenfalls besondere Salzgemischzulagen erhielten.

Das Ergebnis meiner Versuche ist folgendes:

1. Beim Hunde ist der CO_2-Sättigungswert des Blutplasmas in den ersten 6 Wochen der avitaminösen Ernährung (vitaminfreies Pferdefleisch, polierter Reis, Schweineschmalz, Salzgemisch) ungefähr ebenso groß, wie während der Periode mit normaler Ernährung. Nur in dem allerletzten Stadium der Avitaminose, *besonders in den beiden letzten Wochen* vor dem Tode, ist dieser Wert etwas *herabgesetzt*. Im Hungerzustande tritt die Verminderung des CO_2-Sättigungswertes des Blutplasmas sehr rapide auf, dieser Wert sinkt zwischen dem dritten und siebenten Hungertage auf ein Minimum, steigt dann wieder etwas an, ohne jedoch die Norm in der Folge erreichen zu können.

2. Bei den Meerschweinchen, die mit trockenem Hafer, Salzgemisch und Wasser ernährt wurden, trat auch nur in der vierten Woche bei dieser avitaminösen Nahrung eine *starke Verminderung* des CO_2-Bindungsvermögens des Blutplasmas auf.

3. Bei den Tauben, die mit poliertem Reis, Wasser und Salzgemisch ernährt wurden, stellte sich nur bei einigen *in der vierten Woche* der avitaminösen Ernährung *eine ganz leichte Herabsetzung des CO_2-Bindungsvermögens des Blutplasmas ein,* bei anderen Tieren war in diesem Stadium sogar das CO_2-Bindungsvermögen des Blutplasmas etwas gesteigert.

Die Normalwerte verhalten sich zu den azidotischen Werten bei den verschiedenen Tierarten wie folgt:

	CO_2-Bindungswert im Normalzustande	CO_2-Bindungswert in der Avitaminose.
Hund	(0,73 – 0,63) Durchschnitt = 0,68	(0,71 – 0,31) Durchschnitt = 0,51
Meerschweinchen . . .	(0,57 – 0,49) Durchschnitt = 0,53	(0,48 – 0,26) Durchschnitt = 0,37
Tauben	(0,66 – 0,49) Durchschnitt = 0,57	(0,66 – 0,39) Durchschnitt = 0,52

Tabelle I. Alkalireserve des Blutplasmas (nach *van Slyke*).

Versuche an Hunden	Woche vor Beginn der avitaminösen Fütterung in Proz.	Woche nach Beginn der avitaminösen Fütterung 1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
Hund Nr. 1 avitaminös	0,73 0,71	0,65	0,71	0,63	0,67	0,59	0,53	0,41 +	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Hund Nr. 2 avitaminös	0,63	0,59	0,69	0,63	—	—	0,61	0,63	0,65	0,49	—	0,55	0,41	—	—	0,31	0,36 +
Hund Nr. 3 avitaminös	0,63 0,65	0,65	0,64	0,70	—	—	—	0,60	0,55	0,51	0,40	0,36	0,33 +	—	—	—	—
Hund Nr. 4 Hunger	0,71 0,68	0,59 0,32 0,34	0,40 0,39 0,38	0,45	0,50	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

Tabelle II. *Tabelle III.*
Alkalireserve des Blutplasmas (nach *van Slyke*).

	Meerschweinchen Nr. 1 Proz.	Nr. 2 Proz.	Nr. 3 Proz.	Nr. 4 Proz.	Tauben Nr. 1 Proz.	Nr. 2 Proz.	Nr. 3 Proz.	Nr. 4 Proz.	Nr. 5 Proz.	Nr. 6 Proz.
Vor der avitaminösen Fütterung										
	0,49	0,57	0,51	0,49	0,49	0,60	0,66	—	0,51	0,49 0,53
Nach der avitaminösen Fütterung										
1. Woche	0,40	—	—	0,36	0,46	—	—	—	0,51	0,30 0,25
2. „	0,40	—	—	0,38	0,41	—	0,59	—	0,49	0,30 +
3. „	0,31	0,29 +	0,31 +	0,33	0,39	0,51	—	0,66 0,78 0,60 + 0	0,56	—
4. „	0,26	—	—	0,28	0,56	0,43	0,65	—	0,48	—

Die Azidosis bei der Avitaminose ist also nicht etwas für das Wesen der Avitaminose Charakteristisches, sondern nur ein Folgezustand, zu dem schließlich die avitaminöse Stoffwechselstörung hinführt, oder gar nur eine zufällige Begleiterscheinung, die mit dem Umfang der Nahrungsaufnahme in den Endstadien der Avitaminose in Verbindung steht, als ein Symptom eines eingetretenen einfachen Hungerzustandes.

Da die Azidosis nur im Endstadium der Avitaminose auftritt, wenn sie überhaupt sich einstellt, und da sie nach meinen Beobachtungen am Hunde und an der Taube, die beide bis ins letzte Stadium der Avitaminose im allgemeinen gut fressen, im Gegensatz zu den Meerschweinchen, bei denen die Aufnahme der trockenen Hafernahrung mit der fortschreitenden Avitaminose sehr zu wünschen übrig läßt, entweder äußerst gering ist oder ganz fehlt, so spricht dieser Umstand dafür, daß dann, wenn im Verlaufe der Avitaminose Azidosis auftritt, es sich um eine einfache Hungererscheinung infolge ungenügender Nahrungsaufnahme per os handelt. Wenn daneben noch Änderungen im zellularen Stoffwechsel infolge der Avitaminose vorkommen sollten, die zu einer leichten Azidosis Veranlassung geben könnten, so spielen diese nach meinen Versuchen nur eine untergeordnete Rolle.

Auch die eingangs erwähnten Beobachtungen am beriberikranken Menschen sprechen im Sinne meiner hier entwickelten Auffassung.

Untersuchungen über den intermediären Kohlenhydratstoffwechsel bei Avitaminose.

I. Mitteilung.

Glykogenbildung und -Umsatz bei der Avitaminose.

Von

P. Rubino und **J. A. Collazo** (Montevideo).

(Aus der experimentell-biologischen Abteilung des pathologischen Instituts der Universität Berlin.)

(Eingegangen am 11. Juni 1923.)

Mit 1 Abbildung im Text.

Eines der hervorstechendsten Symptome der Störung des Kohlehydratstoffwechsels bei der Avitaminose ist die enorme Verminderung des Glykogengehaltes des Körpers. In erster Linie zeigt sich die Leber dabei beteiligt, deren Glykogen bis auf geringfügige Spuren gewöhnlich verschwunden ist [*Funk* und *Schönborn*[1]), *Ogata*[2]), *Collazo*[3]), *Abderhalden*[4])]. Der Muskel enthält dabei in der Regel etwas mehr Glykogen als die Leber.

Alle diese Beobachtungen wurden derart gewonnen, daß man Tiere längere Zeit avitaminös ernährte und dann tötete. Die avitaminöse Nahrung bestand gewöhnlich bei Tauben aus Reis, bei Meerschweinchen aus Hafer und beim Hunde aus Pferdefleisch, Reis und Schweineschmalz neben den Salzgemischgaben.

Bei den avitaminösen Reistauben findet man im Gesamtkörper ohne die Leber und die Federn etwa 0,3% Glykogen. Der Gehalt der Muskulatur muß dann natürlich etwas höher sein, da ja die Muskeln die Hauptglykogenträger, abgesehen von der Leber, sind. Man wird wohl den Glykogengehalt des avitaminösen Reistaubenmuskels danach auf etwa 0,5% Glykogen veranschlagen dürfen. Alle Glykogenwerte bei der Avitaminose sind außerdem geringer als die entsprechenden Werte bei Hungertieren. Auffallend bei diesen Beobachtungen ist, daß bei den Reistauben das Leberglykogen in so sehr viel stärkerem Maße schwindet als das Muskelglykogen. Das Muskelglykogen ist bei der Reistaube im Vergleich zur Norm natürlich auch stark reduziert. etwa auf die Hälfte gesunken. Aber dennoch scheint der Muskel bei

[1]) *Funk* und *Schönborn*, Journ. of Phys. **48**, 328, 1914.
[2]) *Ogata* und Mitarbeiter, Japan. med. Wochenschr. 1922 (japanisch)
[3]) *Collazo*, diese Zeitschr. **136**, 1923.
[4]) *Abderhalden*, Pflügers Arch. **197**, 1922.

der avitaminösen Reistaube sein Glykogen immerhin etwas zäher festzuhalten, als es die Leber vermag.

Diese Beobachtung schien darauf hinzudeuten, daß bei der Reistaube die Glykogenbildung aus den Kohlehydraten des Reises nicht unmöglich ist, daß sie entweder nur herabgesetzt ist, oder daß das gebildete Glykogen nicht als solches festgehalten werden kann, oder daß beide Störungen vorliegen. Wenn bei der Avitaminose gebildetes Glykogen nicht festgehalten werden kann, dann müßte sich das so nachweisen lassen, daß man avitaminöse Reistauben ad hoc mit einer größeren Menge von Traubenzucker füttert und dann stündlich den Glykogengehalt der Leber und der Muskeln untersucht. Man müßte dann in den ersten Stunden eine starke Glykogenvermehrung und in den folgenden wieder eine sehr rapide Abnahme des Glykogens beobachten.

Diese Vermutung ist in der Tat richtig, wie unsere Versuche an Tauben beweisen. Nach der Fütterung von 5 g Traubenzucker, in 10 ccm Wasser gelöst und in den Kropf eingegossen, fanden wir nach der zweiten Stunde eine enorme Anreicherung der Leber und der Muskulatur mit Glykogen, die bereits am Ende der vierten Stunde von 9 auf 4,8 % bei der Leber und von 1 auf 0,3 % bei dem Muskel gesunken waren.

Daraus ergibt sich, *daß nach der Fütterung mit Glykose Leber und Muskel bei der Reistaube sehr rasch Glykogen in großem Umfange bilden, daß aber dieses Glykogen auch fast ebenso rasch wieder verschwindet.*

Bei *normalen Tauben* findet unter diesen Umständen ebenfalls *eine gesteigerte Glykogenbildung in Leber und Muskel statt;* aber *einen so rapiden Glykogenschwund haben wir nicht beobachtet.*

Alles das zeigt jedenfalls, daß die bisherige Vorstellung, *bei der Avitaminose sei die glykogenbildende Funktion der Zelle herabgesetzt, nicht richtig ist. Die Glykogenbildung kann nach wie vor in durchaus normalem Umfange, ja in überstürzter Weise vollzogen werden, wie unsere neuen Versuche zeigen. Gestört ist zunächst nur bei der Avitaminose die Glykogenspeicherung, oder es sind Wirkungen vorhanden, die das gebildete Glykogen in verstärktem Maße umsetzen. Charakteristisch für die Avitaminose ist jedenfalls der rapide Glykogenzerfall in unmittelbarem Anschluß an die Glykogenbildung, was dann natürlich zu der bekannten Glykogenarmut des avitaminösen Körpers führen muß.*

Da nun eine solche Glykosezufuhr bei Reistauben, wie sie bei unseren vorliegenden Versuchen vorgenommen wurde, obendrein nach einigen Stunden zu toxischen Allgemeinerscheinungen, ja zum Tode der Tiere führen kann, wird wahrscheinlich auch der Glykogenabbau bei der Avitaminose über abnorme toxische, intermediäre Stoffwechselprodukte verlaufen, wie das der eine von uns (*Collazo*) früher allgemein für den Zuckerstoffwechsel angenommen hat.

Diese rapide Glykogenzerstörung nach der anfänglichen Glykogenbildung geht dann so weit, *daß der Glykogengehalt der Leber bei der Avitaminose zu Zeiten, in denen nicht unmittelbar vorher eine verstärkte Kohlehydratfütterung stattgefunden hat, bis auf Spuren absinkt, und daß auch der Glykogengehalt des Muskels, wenn auch nicht in gleich intensiver Weise, subnormale Werte erreicht.*

Bei der gewöhnlichen Reisfütterung oder auch bei einer forcierten Stärkefütterung (vgl. unsere folgenden Versuche der Gruppe 2) wird immer nur wenig Zucker der Leber und dem Muskel zugeführt. *Das wenige Glykogen, das sich daraus bilden kann, wird auch wieder sofort umgesetzt.* Dann kann es natürlich niemals zu einer vorübergehenden starken Anreicherung von Glykogen kommen im Gegensatz zu den Versuchen mit forcierter Zuckerfütterung.

Die Erscheinung, daß der Muskel sein Glykogen etwas besser speichert bei der Avitaminose, als es die Leber mit ihrem Glykogen tut, kann ebensowohl ihre Ursache in einem verschiedenen Verhalten der Zellen beider Organe, wie auch in verschiedenen chemischen Eigenschaften des Leber- und Muskelglykogens oder endlich in beiden Faktoren haben.

Nachdem wir so gezeigt hatten, daß die avitaminöse Reistaube auf eine einmalige verstärkte Glykosezufuhr mit verstärkter Glykogenbildung antwortet, legten wir uns die Frage vor, ob die Reistaube sich bei der einmaligen verstärkten Zufuhr *anderer* Kohlehydrate in gleicher Weise verhält. Wir haben hier nicht die Stundenversuche gemacht, um die Kurve des Glykogenwechsels in Leber und Muskel zu ermitteln, sondern wir haben jedesmal eine avitaminöse Reistaube mit 10 g eines Kohlehydrates per os gefüttert, dann das Tier etwa 4 Stunden später getötet und den Glykogengehalt der Leber und der Muskeln untersucht.

Nach unseren obigen Versuchen fällt bei den avitaminösen Tieren in die zweite Stunde bereits der absteigende Schenkel der Kurve des Glykogenwechsels, bei den Normaltieren aber der aufsteigende Schenkel. Wenn bei unseren ersten Versuchen 5 g Glykose, und bei den jetzigen Versuchen allemal die doppelte Menge Kohlehydrate (10 g) gegeben wurden, so konnte das wohl nur so wirken, daß der Abfall der Kurve bei den avitaminösen Tieren hinausgeschoben würde; der Anstieg der Kurve bei den Normaltieren muß unter diesen Umständen aber auch hinausgeschoben worden sein. Da wir bei unserer zweiten Gruppe von Versuchen ebenfalls Normaltiere mit avitaminösen Tieren unter denselben Bedingungen verglichen, so zeigen unsere Versuche jedenfalls, ob bei forcierter einmaliger Fütterung mit verschiedenen Kohlehydraten sich das avitaminöse Tier ebenso oder anders verhält wie das Normaltier hinsichtlich seines Leber- und Muskelglykogengehaltes zur selben Zeit (3 bis 4 Stunden) nach der Fütterung.

Wir fanden, daß nach der Gabe von Glykose, Lävulose, Galaktose, Saccharose, Maltose, Lactose und Kartoffelstärke die avitaminöse Reistaube Glykogen bildet, und daß der Glykogengehalt der Leber und Muskulatur bei den Reistauben 4 Stunden nach der forcierten Fütterung ungefähr derselbe war wie bei den normalen Kontrolltauben.

Funk und *Schönborn* haben vitaminfreie Tauben mit Zucker- und Stärkeüberschuß ernährt. Sie fanden beim Zucker in der Leber eine reichliche Glykogenbildung vor, die mit unseren Versuchen übereinstimmt. Bei *lange andauernder* Stärkefütterung fand sich kein Glykogen vor. Wir fanden, daß nach *einmaliger Stärkegabe* und alsbaldiger Tötung der Tiere *die Leber glykogenreich war*. Es kommt also offenbar auf *den Zeitpunkt* der Untersuchung nach der forcierten einmaligen Kohlehydratzufuhr an.

Und dennoch besteht ein Unterschied in dem Verhalten der beiden Tiergruppen: die normalen Tauben konnten sämtlich 4 Stunden nach der Fütterung bei bester *Gesundheit* getötet werden; die avitaminösen Tiere aber waren entweder *schwer erkrankt*, zeigten die bekannten nervösen Symptome des Opistotonus, der Zwangsbewegungen usw., die plötzlich zum Ausbruch gelangt waren, oder befanden sich in Agonie oder waren gar im Verlaufe der dritten oder vierten Stunde nach der Fütterung schon spontan gestorben.

Das Ergebnis aller unserer Versuche ist folgendes:

1. Die Glykogenbildung ist bei avitaminösen Tieren (Tauben, Meerschweinchen und Hunden) *nicht herabgesetzt, sondern vollzieht sich eher in beschleunigter Weise.*

2. Glykogen wird bei avitaminösen Tieren aus den *verschiedensten Kohlehydraten der Nahrung gebildet.*

3. Die *Glykogenspeicherung* ist bei der avitaminösen Reistaube *intensiv gestört*; *die Leber verliert rascher und in größerem Umfange bei ihr das Glykogen als der Muskel.*

4. *Beim Abbau des Glykogens bzw. Zuckers entstehen vielleicht bei der avitaminösen Reistaube toxische Produkte.*

5. Wenn man diese Beobachtungen (1 bis 4) mit den Beobachtungen über den Reduktionswert des Blutes bei avitaminösen Reistauben unter entsprechenden Versuchsbedingungen *vergleicht*, so findet man, daß *nach der Gabe von 10 g Kohlehydrat per os 2 Stunden nach der Fütterung der Reduktionswert des Blutes bereits das Maximum überschritten hat und auf den Vorversuchswert gesunken ist. Zu dieser Zeit hat aber die Glykogenanreicherung von Leber und Muskel gerade ihr Maximum erreicht. Der Glykogenabfall* in Leber und Muskel *geht also nicht konform mit dem Abfall des Blutreduktionswertes, sondern erfolgt zeitlich viel später. Es muß also auch der aus dem Glykogen sich bildende Zucker sofort in rapider Weise weiter verändert werden, da kein erneuter Anstieg des Blutreduktionswertes stattfindet.* Hier verhält sich die avitaminöse Taube wie die normale Taube. Der Unterschied ist im Blutreduktions-

wert nur der, daß er generell, d. h. auch ohne besondere Zuckerzufuhr, im späteren Stadium der Avitaminose erhöht ist im Vergleich zur Norm. *Das Krampfstadium aber fällt nun mit dem Abbau des Glykogens in Leber und Muskel zusammen. Also müssen hier auch toxische Produkte gebildet werden, und in dieser intermediären Periode liegt die Hauptstörung.* Da in dieser Periode des Glykogenabbaues sich der Blutreduktionswert nicht ändert, kommt es jedenfalls im Blute nicht zu einer Anreicherung reduzierender Substanzen; ob das im Gewebe der Fall ist, ist nicht zu entscheiden.

Bei einer Betrachtung der Versuchstabellen sind nun noch zwei Dinge auffallend. Aus den Tabellen der Stundenversuche I bis V geht hervor, daß nach der Glykosefütterung die Glykogenanreicherung der Leber in der Norm und im avitaminösen Zustande von gewissen individuellen Faktoren abhängig ist. Außerdem ist bemerkenswert, daß bei den Versuchen an Tauben, die sich in der vierten Woche der Avitaminose befanden, eine nennenswerte Glykogenstapelung in der Leber nicht gefunden wurde; nur der Muskel war sichtlich glykogenreicher geworden. Man könnte nun denken, daß schließlich auch in den Endstadien der Avitaminose das Glykogenbildungsvermögen nachließe. Wahrscheinlicher aber erscheint uns die Annahme, daß der Glykogenabbau in erster Linie in dieser Zeit eine rapide Beschleunigung erfahren hat, und daß das vor allem für das aus Glykose gebildete Glykogen gilt. Denn aus den Versuchen der Tabelle X über den Glykogengehalt der Leber von Reistauben in der vierten Woche der avitaminösen Fütterung ergibt sich, daß aus der Saccharose und der Stärke im Gegensatz zu der Lactose und noch mehr im Gegensatz zu der Dextrose und Lävulose sehr bedeutende Glykogenmengen gebildet und gespeichert werden können. Auf Differenzen in der Resorption aus dem Darme kann das nicht beruhen, weil eine immerhin mögliche langsamere Resorption von Saccharose und Stärke im Gegensatz zu den anderen Kohlehydraten ja auch eine langsamere Glykogenbildung machen müßte. Wenn dann der Glykogenabbau bei allen Glykogenen von verschiedener Provenienz gleichmäßig vonstatten ginge, dann müßte gerade die Leber nach der Saccharose- und Stärkefütterung besonders glykogenarm sein. Da das Gegenteil der Fall ist, muß man daran denken, daß das aus Dextrose und Lävulose gebildete Glykogen rascher zerstört wird, als das aus Lactose und besonders aus Saccharose und Stärke hervorgegangene Glykogen, oder daß die Speicherungsfähigkeit der Leber für diese letzten Glykogenarten bei der Avitaminose eine bessere ist. Das würde dann aber dazu führen, überhaupt verschiedene Glykogenarten anzunehmen, eine Frage, die zum mindesten diskutiert zu werden verdient. Der diabetische Körper bildet ja auch aus Lävulose im Gegensatz zur Dextrose besser Glykogen

und speichert es auf. So könnte allerdings auch im avitaminösen Körper vorzüglich die Glykogenbildung aus Dextrose entstehen.

Zu allen unseren Versuchen ist jedenfalls so viel zu sagen, daß dann, wenn Glykogen nachweisbar ist, es auch gebildet und gespeichert sein muß, daß aber, wenn kein Glykogen nachweisbar ist, es wohl gebildet gewesen sein kann, aber wieder ebenso rasch zerstört zu sein vermag. Exakt beweisen läßt sich das natürlich nicht Aber aus den Stundenversuchen geht hervor, daß bei der Avitaminose gebildetes Glykogen wieder auffallend rasch zerstört wird. Und das spricht doch mehr für eine gesteigerte Zerstörung und mangelhafte Speicherungsfähigkeit als für eine Bildungshemmung, ohne die letztere natürlich ganz ausschließen zu können.

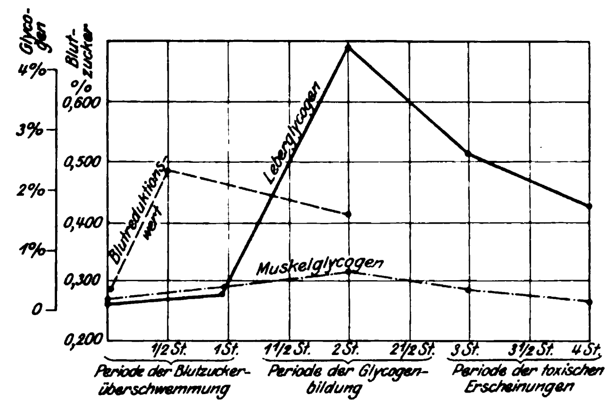


Abb. 1. Die Glykogenkurve ist gewonnen durch Zusammenstellung der Ergebnisse bei *verschiedenen* Tauben, die alle zu verschiedenen Zeiten (Intervall von je 1 Stunde) getötet worden sind. Die Blutreduktionskurve ist an zehn Tauben gewonnen. Alle Tiere befanden sich im Stadium der ausgesprochenen Avitaminose.

Stundenversuche.

(Die Kontrolltiere wurden ohne voraufgehende Zuckergabe getötet. Die Tiere der Nr. 2 bis 5 erhielten 5 g Glykose und wurden dann um die verzeichnete Stundenzahl nach der Zuckergabe getötet. Das Glykogen wurde nach der *Pflüger*schen Methode unter Verwendung der Zuckerbestimmungsmethode nach *Bertrand* analysiert.)

Tabelle I. Normale Tauben.

Nr.	Zeit der Tötung nach der Zuckergabe	Glykosegabe per os	Leber			Muskel		
			Gewicht der Leber	Total-Glykogengehalt der Leber	Glykogen	Gewicht des analysierten Teiles	Total-Glykogen von 50 g Muskel	Glykogen
		g	g	g	%	g		%
1	Kontrolle	0	8	0,272	3,40	50	0,160	0,32
2	Nach 2 Std.	5	8	0,475	5,93	50	0,420	0,84
3	„ 4 „	5	8	0,570	7,12	50	0,310	0,62
4	„ 6 „	5	8	0,550	6,85	50	0,430	0,86

Tabelle II. Avitaminöse Tauben (3 Wochen).

Nr.	Zeit der Tötung nach der Zuckergabe	Glykosegabe per os	Leber			Muskel		
			Gewicht der Leber	Total-Glykogengehalt der Leber	Glykogen	Gewicht des analysierten Teiles	Total-Glykogen von 50 g Muskel	Glykogen
		g	g	g	%	g		%
1	Kontrolle .	0	5	0,010	0,20	50	0,125	0,25
2	Nach 1 Std.	5	5	0,012	0,24	50	0,225	0,45
3	„ 2 „	5	5	0,500	10,00	50	0,545	1,09
4	„ 3 „	5	4,5	0,165	3,60	50	0,360	0,72
5	„ 4 „	5	6	0,250	4,10	50	0,150	0,30

Tabelle III. Normale Tauben.

Nr.	Zeit der Tötung nach der Zuckergabe	Glykosegabe per os	Leber			Muskel		
			Gewicht der Leber	Total-Glykogengehalt der Leber	Glykogen	Gewicht des analysierten Teiles	Total-Glykogen von 50 g Muskel	Glykogen
		g	g	g	%	g		%
1	Kontrolle .	0	10	0,100	1,00	50	0,150	0,30
2	Nach 2 Std.	5	9	0,100	1,11	50	0,150	0,30
3	„ 4 „	5	7	0,350	5,00	50	0,140	0,28
4	„ 6 „	5	9	0,512	5,69	50	0,360	0,72

Tabelle IV. Avitaminöse Tauben (2 Wochen).

Nr.	Zeit der Tötung nach der Zuckergabe	Glykosegabe per os	Leber			Muskel		
			Gewicht der Leber	Total-Glykogengehalt der Leber	Glykogen	Gewicht des analysierten Teiles	Total-Glykogen von 50 g Muskel	Glykogen
		g	g	g	%	g		%
1	Kontrolle .	0	5	0,004	0,08	50	0,045	0,09
2	Nach 1 Std.	5	5	0,020	0,41	50	0,060	0,12
3	„ 2 „	5	6	0,171	2,85	50	0,145	0,29
4	„ 3 „	5	4	0,183	3,60	50	0,150	0,30
5	„ 4 „	5	5	0,060	1,20	50	0,050	0,10

Tabelle V. Avitaminöse Tauben (4 Wochen).

Nr.	Zeit der Tötung nach der Zuckergabe	Glykosegabe per os	Leber			Muskel		
			Gewicht der Leber	Total-Glykogengehalt der Leber	Glykogen	Gewicht des analysierten Teiles	Total-Glykogen von 50 g Muskel	Glykogen
		g	g	g	%	g		%
1	Kontrolle .	0	6	0,001	0,02	50	0,045	0,09
2	Nach 1 Std.	5	5	0,030	0,60	50	0,100	0,20
3	„ 2 „	5	5	0,010	0,20	50	0,240	0,48
4	„ 3 „	5	5	0,030	0,60	50	0,025	0,05
5	„ 4 „	5	4,5	0,004	0,09	50	0,032	0,06

Tabelle VI.

Versuche in der Zeit vom 25. bis 31. Tage der avitaminösen Fütterung.

Taube			Leber			Muskel		
Nr.	Verabreichte Substanz per os	Menge g	Gewicht der Leber g	Total-Glykogengehalt der Leber g	Glykogen %	Gewicht des analysierten Teiles g	Total-Glykogen von 50 g Muskel	Glykogen %
1	Glykose . . .	10	5	0,270	5,4	50	0,150	0,3
2	Lävulose . .	10	5	0,102	2,04	50	0,300	0,6
3	Galaktose . .	10	6	0,050	1,00	50	0,190	0,4
4	Saccharose .	10	6	0,075	1,05	50	0,100	0,2
5	Maltose . . .	10	5	0,100	2,00	50	0,105	0,2
6	Lactose . . .	10	6	0,050	1,00	50	0,150	0,3
7	Stärke . . .	10	7	0,044	0,60	50	0,290	0,6
8	Öl	10	6	0,067	1,30	50	0,080	0,16

Getötet 4 Stunden nach der Gabe der betreffenden Substanz.

Tabelle VII.

Versuche in der Zeit vom 25. bis 31. Tage der avitaminösen Fütterung.

Taube			Leber			Muskel		
Nr.	Verabreichte Substanz per os	Menge g	Gewicht der Leber g	Total-Glykogengehalt der Leber g	Glykogen %	Gewicht des analysierten Teiles g	Total-Glykogen von 50 g Muskel	Glykogen %
9	Glykose . . .	10	6	0,190	3,1	50	0,13	0,26
10	Lävulose . .	10	5	0,105	2,0	50	0,15	0,30
11	Galaktose . .	10	5	0,050	1,0	50	—	—
12	Saccharose .	10	5	0,050	1,0	50	0,10	0,20
13	Maltose . . .	10	7	0,130	1,8	50	0,08	0,16
14	Lactose . . .	10	5	0,050	1,0	50	0,19	0,40
15	Stärke . . .	10	5	0,010	0,5	50	0,20	0,40
16	Öl	10	5	0,075	1,5	50	0,09	0,18

Getötet 4 Stunden nach der Gabe der betreffenden Substanz.

Tabelle VIII.

Versuche in der Zeit der zweiten Woche der avitaminösen Fütterung.

Taube			Leber			Muskel		
Nr.	Verabreichte Substanz per os	Menge g	Gewicht der Leber g	Total-Glykogengehalt der Leber g	Glykogen %	Gewicht des analysierten Teiles g	Total-Glykogen von 50 g Muskel	Glykogen %
17	Dextrose . .	10	5	0,090	1,80	50	0,380	0,76
18	Lävulose . .	10	5	0,110	2,20	50	0,174	0,34
19	Galaktose . .	10	4	—	—	50	—	—
20	Saccharose .	10	6	—	—	50	0,270	0,54
21	Stärke . . .	10	5	0,175	3,40	50	0,140	0,30
22	Öl	10	6	0,102	1,70	50	0,063	0,12

Getötet 6 Stunden nach der Gabe der betreffenden Substanz.

Tabelle IX.

Versuche in der Zeit der zweiten Woche der avitaminösen Fütterung.

Taube			Leber				Muskel		
Nr.	Verabreichte Substanz per os	Menge g	Gewicht der Leber g	Total-Glykogengehalt der Leber g	Glykogen %	Gewicht des analysierten Teiles g	Total-Glykogen von 50 g Muskel	Glykogen %
23	Dextrose . .	10	5	0,145	2,80	50	0,160	0,30
24	Lävulose . .	10	5	0,067	1,30	50	0,210	0,42
25	Saccharose .	10	6	0,105	1,70	50	0,240	0,50
26	Maltose . . .	10	5	0,060	1,20	50	0,136	0,26

Getötet 4 Stunden nach der Gabe der betreffenden Substanz.

Tabelle X.

Versuche in der Zeit der vierten Woche der avitaminösen Fütterung.

Taube			Leber			Muskel		
Nr.	Verabreichte Substanz per os	Menge g	Gewicht der Leber g	Total-Glykogengehalt der Leber g	Glykogen %	Gewicht des analysierten Teiles g	Total-Glykogen von 50 g Muskel	Glykogen %
27	Dextrose . .	10	5	0,052	1,04	50	0,175	0,35
28	Lävulose . .	10	5	0,058	1,16	50	0,200	0,40
29	Saccharose .	10	4	0,416	10,40	50	0,305	0,61
30	Lactose . . .	10	5	0,113	2,26	50	0,250	0,50
31	Stärke . . .	10	6	0,637	10,51	50	0,308	0,61
32	Öl	10	6	0,068	1,12	50	0,175	0,35

Getötet 6 Stunden nach der Gabe.

Tabelle XI.

Versuche an normalen Tauben.

			Leber			Muskel		
Nr.	Verabreichte Substanz per os	Körpergewicht g	Gewicht der Leber g	Total-Glykogengehalt der Leber g	Glykogen %	Gewicht des analysierten Teiles g	Total-Glykogen von 50 g Muskel	Glykogen %
33	Dextrose . .	400	10	0,500	5,00	—	—	—
34	Lävulose . .	390	10	0,620	6,20	—	—	—
35	Galaktose . .	350	9	0,290	3,20	—	—	—
36	Saccharose .	300	9	0,170	1,90	—	—	—
37	Lactose . . .	290	7	0,235	3,30	—	—	—
38	Maltose . . .	390	8	0,215	2,70	—	—	—
39	Stärke . . .	360	7	0,102	1,40	—	—	—

Getötet 4 Stunden nach der Gabe.

Tabelle XII[1])[2]).

Versuche in der Zeit der zweiten bis vierten Woche der avitaminösen Fütterung.

Meerschweinchen			Leber			Muskel			
Nr.	Verabreichte Substanz per os	Körpergewicht g	Gewicht der Leber g	Total-Glykogengehalt der Leber g	Glykogen %	Gewicht des analysierten Teiles g	Total-Glykogen von 50 g Muskel	Glykogen %	Bemerkungen
40	Dextrose	300 200	12	0,240	2,00	50	0,448	0,896	4 Wochen
41	„	300 250	14	0,288	2,06	50	0,099	0,198	2 „
42	Lävulose	300 200	12	0,248	2,07	50	0,049	0,098	4 „
43	„	300 240	12	0,195	1,63	50	0,049	0,098	2 „
44	Galaktose	300 200	13	0,303	2,33	50	0,200	0,401	4 „
45	Saccharose	—	10	0,150	1,50	50	0,043	0,086	3½ „
46	Stärke	350 210	14	0,140	1,00	50	0,300	0,600	3½ „

Tabelle XIII[2]).

Versuche in der Zeit der neunten bis zehnten Woche der avitaminösen Fütterung.

Hunde			Leber		Muskel		Herz		
Nr.	Verabreichte Substanz per os	Körpergewicht g	Gewicht zur Analyse g	Glykogen %	Gewicht des analysiert. Teiles g	Glykogen %	Organisches Gewicht g	Glykogen %	Bemerkungen
47	100 g Glykose	6200	100	3,90	100	0,76	61	—	9 Wochen
48	150 g Stärke	4390	100	1,46	100	0,80	49	—	10 „

[1]) Von den Körpergewichtszahlen gibt die obere Zahl das Tiergewicht vor Beginn der Avitaminose, die untere Zahl das Tiergewicht zur Zeit der Versuchsvornahme während der Avitaminose an.

[2]) Die Glykogenwerte dieser Tierarten bei Avitaminose und Hungersubstanzen ohne akute, forcierte Kohlehydratfütterung finden sich in der Arbeit „Glykogen und Avitaminose", diese Zeitschrift 136, 1923.

Beobachtungen über die Mutarotation der Glucose in wässerig-alkoholischen Lösungen.

Von

Hans v. Euler und Elsa Erikson.

(Aus dem biochemischen Laboratorium der Hochschule Stockholm.)

(Eingegangen am 12. Juni 1923.)

Mit 1 Abbildung im Text.

Man verdankt bekanntlich *Bourquelot* und seinen Mitarbeitern, besonders *Bridel*, *Hérissey* und *Aubry*, die Kenntnis der Gleichgewichte zwischen Alkylglucosiden, Glucose und dem entsprechenden Alkohol. Die Untersuchungen, welche ausgezeichnete Beweise für die Reversibilität der Enzymwirkungen darstellen, beziehen sich sowohl auf α- wie auf β-Glucose. Es hatte sich ergeben, daß die Gleichgewichte

$$\frac{\alpha\text{-Glucose}}{\alpha\text{-Äthylglucosid}} \qquad \frac{\beta\text{-Glucose}}{\beta\text{-Äthylglucosid}}$$

zahlenmäßig verschieden sind, und ferner haben *Bourquelot* und *Bridel*[1]) einen interessanten Versuch angestellt über die Gleichgewichtslage in einer wässerig-äthylalkoholischen Glucoselösung, welche gleichzeitig α- und β-Alkylglucosidase enthält.

Zur weiteren Auswertung der genannten Gleichgewichtskonstanten und zur Behandlung der Mutarotationsisomerie (***Mutamerie***) wurden hier einige Arbeiten begonnen, welche das Verhalten der Glucose in wässerig-alkoholischen Lösungen in Abwesenheit von Enzymen behandeln. Einen Anfang bildet die vorliegende kleine Mitteilung.

In reinen wässerigen Glucoselösungen stellt sich bekanntlich ein Gleichgewicht zwischen α- und β-Gluçose ein, welches zu einer spezifischen Enddrehung $[\alpha]_D = 52{,}5^0$ führt[2]). Daß diese Enddrehung von der Natur des Lösungsmittels abhängig ist, ergibt sich schon aus den bekannten Vorschriften zur Darstellung reiner α- und reiner β-Form. Außerdem findet man ausdrückliche Hinweise darauf in einer bemerkenswerten Mitteilung von *Irvine* und *Steele*[3]), durch welche die

---

[1]) *Bourquelot* und *Bridel*, Journ. de Pharm. et de Chim. (7) **9**, **104**, 230, 1913 und **10**, 361 und 393, 1914.

[2]) *Tanret*, Bull. Soc. Chim. **15**, 195, 1896.

[3]) *Irvine* und *Steele*, Journ. chem. Soc. **107**, 1230, 1915.

früher von *E. Frankland Armstrong*[1]) erwähnte Auffassung der Mutarotation als intermediäre Hydratation[2]) gestützt wird. Die kleine Erhöhung der spezifischen Drehung, welche in alkoholischen Glucoselösungen bis 50% Alkohol nach Eintritt des Gleichgewichtes eintritt, kann zwar auf einer Verschiebung des Gleichgewichtes zwischen der α- und β-Form beruhen, aber eine Berechnung der Gleichgewichtsverschiebung scheint uns teils wegen des Auftretens einer dritten Gleichgewichtsform, teils wegen anderer Einflüsse des Lösungsmittels auf die Drehung zu unsicher[3]). Wir haben deshalb für jede Alkoholkonzentration die Endwerte experimentell bestimmt und mit den so gefundenen Zahlen gerechnet.

Der nächste Zweck unserer Untersuchung war folgender: Eine Reihe von Enzymen, ganz besonders Saccharase, zeigt eine auffallende Empfindlichkeit gegen Alkohol und wird besonders in Alkoholkonzentrationen zwischen 30 und 70% sehr schnell inaktiviert. Wir haben uns gefragt, ob diese Inaktivierung auf einer Umlagerung der die spezifische Bindung des Substrats vermittelnden Gruppe beruhen kann, und ob man einen solchen Einfluß des Alkohols bei dem Typus von Reaktionen, welcher durch die Mutarotation der Glucose repräsentiert wird, wieder findet.

Methodisches.

Bezüglich der Ausführung der kinetischen Bestimmungen können wir auf eine diesbezügliche Arbeit aus dem hiesigen Laboratorium von *Euler* und *Hedelius*[4]) verweisen. Wir haben uns an das daselbst festgestellte Maximum der Stabilität bzw. Minimum der Umwandlungsgeschwindigkeit, $p_H = 3{,}0$ bis $3{,}1$, gehalten[5]).

Nun besteht hinsichtlich der Aziditätsmessungen in Lösungen, welche 30 und mehr Prozent Alkohol enthalten, einige Unsicherheit.

---

[1]) *E. F. Armstrong*, Journ. chem. Soc. **83**, 1305, 1903. Vgl. über den Mechanismus der Mutarotation auch *Boeseken*, Chem. Ber. **46**, 2612, 1913.

[2]) *Riiber*, Chem. Ber. **55**, 3132, 1922.

[3]) Siehe hierzu auch *L. Zechmeister*, Zeitschr. f. physik. Chem. **103**, 316, 1923. Ferner *Euler*, Ber. d. deutsch. chem. Ges. **39**, 344, 1906.

[4]) *Euler* und *Hedelius*, diese Zeitschr. **107**, 150, 1920. S. auch *Euler*, *Myrbäck* und *Rudberg*, Sv. Vet. Akad. Arkiv f. Kemi 8, Nr. 28, 1923.

[5]) Die schon längere Zeit bekannte starke Abhängigkeit der Mutarotation von der Wasserstoffionenkonzentration ist durch *Osaka* sowie besonders durch *Hudson* und seine Schüler studiert worden. Aus der seither mit moderneren Methoden festgestellten Aziditätskurve wird deutlich, daß sich reaktionskinetische Untersuchungen über Mutarotation, bei welchen p_H nicht exakt festgestellt ist, theoretisch nicht verwerten lassen. Die Änderung der Mutarotationsgeschwindigkeit mit wechselndem p_H ist in einigem Abstand vom Minimum so erheblich, daß sie oft andere Einflüsse vortäuscht oder verdeckt.

insofern die nach der kolorimetrischen Methode ermittelten p_H-Werte nicht mehr mit den elektrometrisch gemessenen übereinstimmen (siehe hierzu auch *Michaelis*, Wasserstoffionenkonzentration, 2. Aufl., 1. Teil).

Es war daher notwendig, für das von uns direkt studierte Gebiet (um $p_H = 3$) kolorimetrische und elektrometrische Messungen durch besondere Versuche vergleichbar zu machen.

Methylorange.

Umschlag orange-gelb	p_H des Umschlagpunktes
Wasser	4,4
25 proz. Alkohol	4,2
50 „ „	3,2 Differenz 1,2
n/10 H_3PO_4, 50 proz. Alkohol	2,02
Gleiche Farbe wie 10 ccm n/10 KH_2PO_4 + 1,85 ccm n/10 H_3PO_4	3,10 Differenz 1,08

Kongo.

Umschlag rot-blau	p_H des Umschlagpunktes
2 ccm n/10 H_3PO_4 + 10 ccm n/10 KH_2PO_4	3,03
Gleiche Farbe wie 0,38 ccm n/10 H_3PO_4, 25 proz. Alkohol + 10 ccm 25 proz. Alkohol	3,01
10 ccm n/10 H_3PO_4, 50 proz. Alkohol + 2 ccm n/10 H_3PO_4 gibt sofort die gleiche Farbe, die nach einigen Minuten von Violett in Blau übergeht, ohne Änderung von p_H	Differenz 1,08

Lackmus.

Umschlag blau-rot	p_H des Umschlagpunktes
n/10 H_3PO_4, 50 proz. Alkohol	2,02
10 ccm n/10 KH_2PO_4 + 1,9 ccm n/10 H_3PO_4	3,06 Differenz 1,04
n/10 H_3PO_4, 50 proz. Alkohol	2,14
Gleiche Farbe wie 10 ccm n/10 KH_2PO_4 + 1,65 ccm n/10 H_3PO_4	3,20 Differenz 1,06

Der Einfluß von 25 proz. Alkohol erwies sich also durchgehends noch als gering, der Einfluß von 50 proz. Alkohol betrug etwa 1 p_H-Einheit.

Die α-Glucose haben wir uns nach den bewährten Vorschriften von *Hudson* und *Dale*[1]) bereitet; den Ausgangswert der Drehung haben wir dadurch festgestellt, daß wir in kurzen Zeiträumen nach der Auflösung der α-Glucose zahlreiche Ablesungen machten und auf die Zeit 0 graphisch extrapolierten.

---

[1]) *Hudson* und *Dale*, Journ. Amer. Chem. Soc. **39**, 320, 1917.

Ergebnisse.

Bei der Azidität $p_H = 3,03$ haben wir zwei Versuchsreihen angestellt, die eine mit Phosphat, die andere mit Citrat als Puffer. Es hatte sich nämlich schon bei den Versuchen von *Euler* und *Hedelius* ergeben, daß die p_H-Kurve stark vom anwesenden Neutralsalz beeinflußt wird[1]).

Bei beiden Versuchsreihen war die Konzentration der Glucose gleich, es wurden nämlich 2 g reinste Glucose in 20 ccm Wasser oder Pufferlösung gelöst. Da der monomolekulare Verlauf der Reaktion unter den von uns gewählten Umständen schon durch zahlreiche frühere Versuche festgestellt ist, kann von einer ausführlichen Wiedergabe der Einzelbeobachtungen abgesehen werden, und wir geben nur die Mittelwerte der Reaktionskonstanten an.

1. Versuchsreihe: Phosphatpuffer.

Vol.-Proz. Alkohol	$k \cdot 10^4$
0	154
30	142
50	116

2. Versuchsreihe: Citratpuffer.

Vol.-Proz. Alkohol	$k \cdot 10^4$
0	91
15	72
25	59
35	52
50	40

Besprechung.

Wie aus den Zahlen und der beigefügten Abbildung ersichtlich ist, sinkt die Geschwindigkeit der Mutarotation mit steigendem Alkoholgehalt der Lösung, und zwar in Gegenwart von Citratpuffer bis 50 Vol.-Proz. Alkohol ganz stetig. Auffallend erscheint die verschiedene Beziehung zwischen Reaktionsgeschwindigkeit und Alkoholgehalt je nach der Art des Puffers; wir kommen hierauf bald zurück. Jedenfalls entspricht die Abnahme der Reaktionsgeschwindigkeit mit steigendem Alkoholgehalt der Größenordnung nach den Befunden bei anderen Reaktionen. So sinkt beispielsweise bei der Rohrzuckerinversion durch verdünnte Salzsäure, nach Messungen von *Kablukow* und

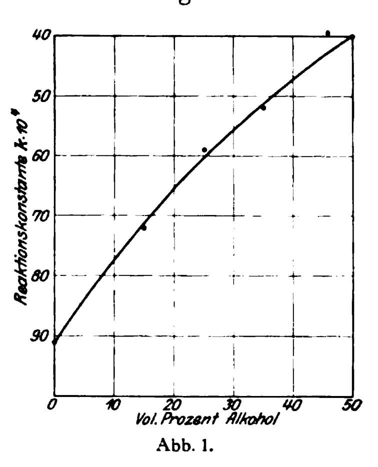


Abb. 1.

[1]) Dies scheint auch durch die zahlreichen Arbeiten von *Murchhauser* (diese Zeitschr. **125**, 158, 1921; **126**, 40, 1922) bestätigt zu werden.

Zacconi[1]), *Cohen*[2]) u. a., die Inversionskonstante zwischen 0 und 50% Alkohol um 20 bis 50%, wie etwa hier die Mutarotationsgeschwindigkeit in Gegenwart von Phosphatpuffer, während die Abnahme in Gegenwart von Citratpuffer über 100% beträgt.

Der Einfluß des Alkohols auf die Stabilität der Saccharase ist sehr viel größer, und wir schließen also aus unseren Ergebnissen, daß *der Inaktivierung der Saccharase eine Reaktion anderer Art als die sterische Umlagerung bei der Mutarotation zugrunde liegt.* Eine Analogie bezüglich der Konzentrationsfunktion des Alkohols läßt sich nur bei den Eiweißkörpern feststellen. Die Verhältnisse entsprechen den für die Hitzeinaktivierung gefundenen. Es besteht zwischen der Temperaturabhängigkeit der Inaktivierungskonstanten k_C der Saccharase und der Temperaturabhängigkeit der Mutarotationskonstanten keine Ähnlichkeit, während die Hitzedenaturierung der Eiweißkörper mit der Hitzeinaktivierung der Enzyme Analogien aufweist.

Gehen wir davon aus, daß der kolloide Bestandteil der Saccharase — sofern es überhaupt berechtigt ist, einen besonderen kolloiden und einen besonderen aktiven Enzymbestandteil anzunehmen — ein proteinähnlicher Körper ist[3]), so scheint für die Auffassung des Anteils der einzelnen Enzymbestandteile an der Aktivität des Enzyms folgendes bemerkenswert: Der Dispersitätsgrad des kolloiden Bestandteils steht nicht in direkter Beziehung zu der Aktivität des Enzyms (Adsorptionsversuch von *Meyerhof*); dagegen können Vorgänge, welche vermutlich in chemischen Änderungen des kolloiden Bestandteils bestehen, die Aktivität des Enzyms wesentlich beeinflussen; man könnte daraus den Schluß ziehen, daß die Affinität der substratbindenden Gruppe des Enzyms in das kolloide Molekül eingeht oder wenigstens vom chemischen Zustande des kolloiden Bestandteils nicht unabhängig ist.

---

1) *Kablukow* und *Zacconi*, Ber. d. deutsch. chem. Ges. **25**, 499, 1892.

2) *Cohen*, Zeitschr. f. physik. Chem. **28**, 145, 1899. Die dort angegebenen Zahlen gelten für eine mit dem Alkoholgehalt variierende Azidität.

3) *Euler* und *Josephson*, Chem. Ber. **56**, 1099, 1923.

Über fluoreszierende Oxydationsprodukte des Bilirubins und deren Bedeutung als Fehlerquelle bei dem üblichen Urobilinnachweis.

Von

H. K. Barrenscheen und **O. Weltmann.**

(Aus dem medizinisch-chemischen Institut und der III. medizinischen Klinik in Wien.)

(Eingegangen am 12. Juni 1923.)

Während die chemische Seite des Urobilinproblems durch die grundlegenden Arbeiten *Hans Fischers* und seiner Mitarbeiter (1) eine weitgehende Klärung gefunden hat, ist die Frage des einwandfreien Nachweises für die Klinik heute noch offen. Die Verhältnisse liegen hier darum so kompliziert, weil beide dem klinischen Nachweis dienenden Reaktionen, die *Ehrlich*sche Aldehydreaktion und die Fluoreszenzprobe mit Zinksalzen nicht eindeutig sind, sondern Gruppenreaktionen darstellen.

Die rote Adelhydreaktion wurde bereits von *Neubauer* (2) als Pyrrolreaktion erkannt, in ihrem chemischen Ablauf von *Hans Fischer* klargestellt und im allgemeinen bei allen instabilen Pyrrolen positiv gefunden. *Neubauer* beschrieb auch bereits die positive Aldehydreaktion des Indols, Skatols und Tryptophans. Auf der anderen Seite ist auch die Fluoreszenz mit Zinksalzen durchaus nicht für das Urobilin allein charakteristisch, sondern kommt einer ganzen Reihe der verschiedensten Abkömmlinge des Blut- und Gallenfarbstoffes zu. Vom Bilirubin, mit dem wir uns hier ausschließlich beschäftigen wollen, erwähnt bereits *Jaffé* (3) 1869, also unmittelbar nach der Entdeckung des Urobilins, ein fluoreszierendes Oxydationsprodukt. Eingehender hat *Stokvis* (4) dann auf diese Tatsache hingewiesen. In seiner Arbeit „Die Identität des Choletelins und Urobilins“ konnte er zeigen, daß durch Oxydation von Bilirubin mit Jodtinktur oder Bleisuperoxyd in Alkohol bei Gegenwart von Chlorzink ein Produkt entsteht, das in seinen wesentlichen Eigenschaften: Fluoreszenz, spektrale Absorption, Farbe, mit dem *Jaffé*schen Urobilin übereinstimmt. Seine daraus gezogene Schlußfolgerung, daß dieses von ihm dem *Maly*schen Choletelin gleichgestellte Oxydationsprodukt mit dem *Jaffé*schen Urobilin identisch sei, erfuhr eine scharfe Zurückweisung durch *Maly* (5), der ohne die *Stokvis*schen Angaben nachzuprüfen, die Unmöglichkeit der Identität eines Oxydations- mit einem Reduktionsprodukt betonte. In der Folgezeit tauchte

dieser fluoreszierende Doppelgänger des Urobilins noch ab und zu in der Literatur auf, namentlich bei der viel diskutierten Frage der Einheitlichkeit des Urobilins und der Trennung in normale und pathologische Urobiline. Es würde zu weit führen, hier die einzelnen, oft widerspruchsvollen Arbeiten anzuführen und sei bezüglich dieser historischen Daten auf die ausführliche Darstellung von *Meyer-Betz* (6) in seinem zusammenfassenden Referat verwiesen.

In der neueren Literatur finden diese Verhältnisse immer weniger Berücksichtigung. Wohl erwähnt *Hildebrandt* (7) die Analogie im spektralen Verhalten des Urobilins und Choletelins, glaubt aber, daß letzterem die Zinkacetatfluoreszenz abgeht. Auch *Huber* (8) weist auf die Analogie der Spektren beider Körper hin, schließt aber mit Rücksicht auf die angeblich fehlende Fluoreszenz jede Verwechslungsmöglichkeit aus. Auf die Angaben *Stokvis* greifen *Fromholdt* und *Nersesoff* (9) zurück, welche die Möglichkeit, daß durch Jodzusatz zur Zinkacetatprobe im Serum auch fluoreszierende Oxydationsprodukte des Bilirubins entstehen könnten, kurz erwähnen, ohne daraus weitere Folgerungen zu ziehen. Schließlich scheint die Erinnerung an eine mögliche Verwechslung von Urobilin und Oxydationsstufen des Bilirubins gänzlich ausgelöscht, nur in Handbüchern führt das fluoreszierende Choletelin von *Stokvis* noch ein bescheidenes Dasein im Kleingedruckten und jede in Körperflüssigkeiten nach Behandlung mit Zinksalzen und den verschiedensten Oxydationsmitteln auftretende Fluoreszenz wurde ohne Bedenken auf das Vorhandensein von Urobilin bezogen. Derartiger Methoden, die als Oxydationsmittel meist alkoholische Jodlösung verschiedener Konzentration oder *Lugol*sche Lösung verwendeten, bedienten sich in neuerer Zeit *Huber* (l. c.), *Lehndorff* (10), *Obermayer* und *Popper* (11), *Steensma* (12), *Marcussen* und *Svend Hansen* (13), *Adler* (14). Da diese Modifikationen auch in Fällen, wo die ursprüngliche *Schlesinger*sche Probe negativ ausfiel, zu positiven Ergebnissen führten, wurde daraus unbedenklich auf eine Verschärfung der Reaktion geschlossen. Auch Resultate, die mit älteren Angaben in direktem Widerspruch standen, konnten das Vertrauen zu der neuen Methode nicht erschüttern, sondern führten zur Aufstellung neuer oder Auffrischung alter Theorien.

Untersuchungen über den Nachweis des Urobilins im Serum brachten uns wieder auf dieses fluoreszierende Oxydationsprodukt des Bilirubins und ließen uns seine Bedeutung als Quelle von Irrtümern erkennen. Versetzten wir Serum von Fällen mit totalem Verschluß des Choledochus, bei denen Urobilin im Harn und Stuhl nur in minimalsten Spuren nachweisbar war, mit der zweifachen Menge Zinkacetatlösung und fügten wir zu dem gelbgefärbten Filtrat vorsichtig ganz verdünnte alkoholische Jodlösung, so erhielten wir regelmäßig intensive Grünfluoreszenz und anscheinend das typische Urobilinspektrum. Die nähere Analyse des Oxydationsvorganges zeigte uns bald, daß der Grünfluoreszenz ein freilich nur kurz dauerndes Stadium einer prachtvollen Rotfluoreszenz vorangeht. Die Farbe des Serumfiltrats ist dabei vorübergehend grün, schlägt aber bald in ein rötliches Gelb um, gleichzeitig wird die Rotfluoreszenz durch Grünfluoreszenz abgelöst. Dieser Befund war gerade bei Fällen mit totalem Verschluß der Gallenwege am deutlichsten ausgeprägt, während Ikterusfälle mit

beträchtlicher Urobilinurie viel schwächeren Ausfall, normale Sera nur spurenweise die Grünfluoreszenz zeigten. Gleichzeitige Bestimmungen des Bilirubins im Serum nach *Hymans van den Bergh* deckte uns einen unverkennbaren Parallelismus zwischen der Höhe des Bilirubingehaltes und der Stärke dieser Grünfluoreszenz auf und wiesen uns auf die nähere Untersuchung reiner Bilirubinlösungen.

Zu den Versuchen wurde reines Bilirubin in Alkohol durch die eben notwendige Menge von Ammoniak in Lösung gebracht — ein etwaiger Überschuß von NH_3 läßt sich durch vorsichtigen Zusatz von Essigsäure leicht abstumpfen. Versetzt man eine solche Bilirubinlösung mit der gleichen Menge gesättigter alkoholischer Zinkacetatlösung und fügt vorsichtig verdünnte Jodtinktur zu, so schlägt die Farbe von Rötlichorange augenblicklich in Grün um. War die Jodlösung nicht zu verdünnt, so tritt gleichzeitig eine prachtvolle Rotfluoreszenz auf, die lebhaft an eine Chlorophyllösung erinnert. Im Spektrum treten zwei Streifen auf — einer im Rot und der zweite schwächere im Gelb, beide durch einen schwachen, mit dem gewöhnlichen Taschenspektroskop kaum sichtbaren Schatten verbunden. Es ist das typische, von *Heynsius* und *Campbell* (15) näher beschriebene Cholecyaninspektrum. Dieses Stadium der Oxydation liegt dem *Auché*schen (16) Bilirubinnachweis zugrunde, dessen Exaktheit und Empfindlichkeit wir nach unseren Erfahrungen bestätigen können. Bei weiterer vorsichtiger Oxydation geht die anfänglich grüne Farbe in ein prächtiges Blau über, die Rotfluoreszenz bleibt unvermindert bestehen, die spektrale Absorption ist die gleiche. Säuert man jetzt die Lösung mit verdünnter Schwefelsäure an, so schlägt die Farbe in Violett um, die Fluoreszenz verschwindet, läßt sich jedoch, unter Umschlag der Farbe in Grünblau, durch Zusatz von Ammoniak bis zur deutlich alkalischen Reaktion wieder hervorrufen. Verwendet man Natronlauge als Alkali, so verschwindet die Fluoreszenz, die Lösung wird rein grünblau. Spektroskopisch zeigt die saure Lösung ein breites Absorptionsband vom Rot bis ins Grün, das Spektrum der ammoniakalischen und natronalkalischen Lösung zeigt die beiden typischen Streifen in Rot und Gelb.

Genauere spektroskopische Messungen wurden von dem einen von uns (*Barrenscheen*) mit einem großen *Hilger*schen Spektroskop durchgeführt. Als Stammlösung wurde eine 0,05proz. ammoniakalische Lösung von Bilirubin in Alkohol verwendet, die in 1 cm dicker Schicht untersucht wurde. Als Lichtquelle diente eine starke Metallfadenlampe. Für die neutrale Lösung wurden folgende Werte ermittelt: Für den Streifen im Rot λ 660 bis 615 $\mu\mu$, die maximale Intensität der Auslöschung beginnt bei λ 643; der Streifen im Gelb ist durch einen ununterbrochenen Schatten mit dem Streifen im Rot verbunden,

seine maximale Intensität liegt bei λ 586,5, gegen das Grün zeigt er unscharfe Abgrenzung bis λ 576 μμ. Stärkere Verdünnung der Lösung bringt den Streifen im Gelb zum Verschwinden, der Streifen im Rot zeigt scharfe Begrenzung zwischen λ 650 und 633. Die schwefelsaure Lösung zeigt ein breites Band von λ 622 bis 574 und eine gleichmäßige Verdunklung des blauen und violetten Endes des Spektrums. Die ammoniakalische bzw. natronalkalische Lösung zeigt den Streifen im Rot scharf begrenzt zwischen λ 650 bis 629 μμ, der Streifen im Gelb ist verwaschen und läßt sich undeutlich abgrenzen.

Fährt man mit der Oxydation vorsichtig fort, so wird die blaue Lösung schmutziggrün. Neben der Rotfluoreszenz tritt eine starke Grünfluoreszenz auf, im Spektrum erscheint neben den beschriebenen Cholecyaninstreifen eine Absorption im Grün, deren Beginn bei λ 535 μμ liegt. Es ist der dem Urobilinspektrum ähnliche Streifen des Choletelins. Weitere Oxydation führt über Olivgrün, Braungrün zu einer rötlichbraunen, intensiv grün fluoreszierenden Lösung, die in ihrem Verhalten von einer Urobilinlösung kaum zu unterscheiden ist. Die saure Lösung ist je nach der Verdünnung braunrot bis rosarot, die alkalische Lösung braungelb bis gelb. Aus der sauren Lösung geht der Farbstoff in Chloroform mit braunroter bis rosenroter Farbe über und läßt sich dem Chloroform mit Alkali wieder entziehen. Mit *Ehrlich*schem Aldehydreagens gibt er Gelbfärbung, die Kupfersulfatprobe nach *Hans Fischer* (17) ist negativ. Die spektroskopische Untersuchung zeigt, daß kein scharf begrenztes Band, vielmehr eine gleichmäßige Absorption gegen das violette Ende des Spektrums vorliegt. Für die ammoniakalische Lösung wurde der Beginn der Auslöschung bei λ 529, für die schwefelsaure bei λ 525, in stärkerer Verdünnung bei λ 512 μμ ermittelt. Die in der Klinik allgemein gebrauchten Taschenspektroskope lassen diese Verhältnisse jedoch nicht klar erkennen, sondern täuschen einen Streifen vor, der auch von erfahreneren Untersuchern mit dem Urobilinstreifen verwechselt werden kann. Die Fluoreszenz besteht auch bei ammoniakalischen Lösungen fort, verschwindet auf Zusatz von Natronlauge oder verdünnter Schwefelsäure. Belichtet, zeigt die ammoniakalische Lösung rasches Verschwinden der Fluoreszenz, die Farbe wird hellgelb, das Spektrum zeigt keine Absorption mehr. Auch die neutrale Lösung zeigt beim Stehen im Dunklen Abnahme der Fluoreszenz, die nach einigen Tagen vollständig verschwindet. Belichtung beschleunigt diesen offenbar auf weitere Oxydation zurückzuführenden Vorgang. Bei zunehmender Verdünnung mit Alkohol läßt sich die Grünfluoreszenz nicht mehr nachweisen. Auch größerer Wasserzusatz kann sie zum Verschwinden bringen.

Die gleichen Erscheinungen wie an reinen Bilirubinlösungen lassen sich auch an gallenfarbstoffhaltigen Körperflüssigkeiten beobachten.

Auf das abweichende Verhalten ikterischer Harne soll weiter unten eingegangen werden. Über das *Serum* haben wir bereits eingangs berichtet. Was dort geschildert wurde, gilt in gleicher Weise für *Exsudate* und *Transsudate.* Besonders schön lassen sich die Erscheinungen am *Duodenalsafte* und an *Fistelgalle* beobachten. *Schweinegalle* mit Zinkacetat *allein* versetzt und dem direkten Sonnenlicht ausgesetzt, zeigt bereits nach wenigen Minuten intensive Grünfluoreszenz und spektroskopisch neben dem Urobilinstreifen die beiden Cholecyaninstreifen, so daß wir annehmen müssen, daß die beobachtete Fluoreszenz nicht ausschließlich auf Urobilin zurückzuführen ist. Sicher urobilinfreie Fistelgalle zeigte diese Erscheinung wohl nicht, erst auf Jodzusatz wurde Rot- bzw. Grünfluoreszenz erhalten. Bei niedrigem Bilirubingehalt oder zu raschem Jodzusatz wird die Stufe der Rotfluoreszenz meist übersprungen, und man gelangt sofort zu dem grünfluoreszierenden Oxydationsprodukt mit dem typischen „Urobilinstreifen". Das ist speziell bei Anwendung der von *Adler* empfohlenen Technik der Fall. Wesentlich anders liegen die Verhältnisse beim Harn. Hier konnten wir auf die geschilderte Weise bei urobilinfreien Ikterusharnen nur die Rotfluoreszenz mit dem Cholecyaninspektrum erreichen. Auch sehr reichlicher Jodzusatz führt nicht zur Grünfluoreszenz. Fällt man jedoch in der üblichen Weise den Gallenfarbstoff bei alkalischer Reaktion durch Calciumsalze, so erhält man im alkoholischen Auszuge des Niederschlages auf Jodzusatz ohne weiteres sämtliche geschilderten fluoreszierenden Oxydationsprodukte. Die speziell von französischen Autoren empfohlene Ausfällung des Gallenfarbstoffes durch das *Denigès*sche Reagens kann auch zu Täuschungen führen, da hierbei schon weitere Oxydationsstufen entstehen, die Urobilin vortäuschen. Wodurch dieses Verhalten des ikterischen Harns gegenüber den anderen Körperflüssigkeiten bedingt ist, vermögen wir mit Bestimmtheit nicht zu sagen. Am wahrscheinlichsten scheint uns für diesen Unterschied neben anderen physikalisch-chemischen Bedingungen die Form der Lösung des Bilirubins maßgebend zu sein.

Was aus diesen Untersuchungen praktisch hervorgeht, ist die Tatsache, daß die allgemein übliche Methode des Urobilinnachweises mit Zinkacetat und Jodzusatz bei allen Körperflüssigkeiten mit Ausnahme des Harns zu Täuschungen führen muß. Wir möchten auf diese Feststellung besonderes Gewicht legen, da in der neueren französischen und deutschen Literatur eine ganze Reihe von Arbeiten erschienen ist, welche zu falschen Schlußfolgerungen gelangten, da sie diese prinzipielle Tatsache nicht berücksichtigten. Wieweit die Verwirrung auf diesem Gebiete gediehen ist, illustrieren die Arbeiten von *Auché* (18), der dem Urobilin das Cholecyaninspektrum unterschiebt, und die Monographie von *Brulé* (19), der das Urobilin gleicher-

weise durch Oxydation und Reduktion entstehen läßt. An diesen Autoren ist scheinbar die ganze, zur chemischen Klärung des Urobilins geleistete Arbeit spurlos vorübergegangen. Auch *Adler* scheint der fluoreszierende Doppelgänger des Urobilins unbekannt zu sein, sonst könnten wir uns nicht erklären, wie er sich auf Grund seiner Befunde zu so weittragenden Schlußfolgerungen berechtigt fühlt. Wenn *Adler* (20) mit der von ihm beschriebenen Methode in Fistelgalle bei totalem Verschluß Urobilin nachgewiesen haben will, so müssen wir auf Grund unserer experimentellen Erfahrung einen derartigen Befund als Täuschung auffassen. Dadurch erscheint aber auch *Adlers* Schlußfolgerung, soweit sie die alte *Hayem*sche Anschauung in neuer Form wiederbringt, ihres angeblich „experimentellen" Beweises beraubt zu sein. Wenn schließlich *Adler* (21) im Gegensatz zum *chemischen* einen *klinischen* Begriff des Urobilins formuliert, der alle Körper mit Fluoreszenzreaktion umfaßt, so muß eine derartige Formulierung — mag sie auch bequem erscheinen — abgelehnt werden, weil sie unbedingt zu Verwirrung führen muß. Wir glauben durch unsere Ausführungen gezeigt zu haben, mit welcher Vorsicht man an die Behandlung des Urobilinproblems herantreten muß. Ob die Aldehydreaktion oder die Fluoreszenzprobe den Vorzug verdient, erscheint uns eine müßige Frage, da beide Reaktionen, wie eingangs erwähnt, als Gruppenreaktionen nicht eindeutig sind. Einige Sicherheit scheint uns in Übereinstimmung mit *Hans Fischer* nur die gleichzeitige Anstellung beider Proben zu bieten.

Literatur.

1) *Hans Fischer*, Hoppe-Seyler **78**, **75** u. ff. — 2) *Neubauer*, Sitz.-Ber. d. Ges. f. Morphol. u. Physiol. in München, Juli 1903. — 3) *Jaffé*, Zentralbl. f. d. med. Wissensch. 1869, S. 117. — 4) *Stokvis*, ebendaselbst 1873, S. 211. — 5) *Maly*, Liebigs Annalen **168**, 77. — 6) *Meyer-Betz*, Erg. d. inn. Med. u. Kinderh. **12**, 1913. — 7) *Hildebrandt*, Deutsch. Arch. f. klin. Med. **59**. — 8) *Huber*, Med. Klin. 1910, Nr. 2. — 9) *Fromholdt* und *Nersesoff*, Zeitschr. f. exper. Path. und. Ther. **11**, 1912. — 10) *Lehndorff*, Prag. med. Wochenschr. 1912, Nr. 34. — 11) *Obermayer* und *Popper*, Wien. med. Wochenschr. 1910, Nr. 44. — 12) *Steensma*, zit. Zentralbl. f. inn. Med. 1915. — 13) *Marcussen* und *Svend Hansen*, Journ. of biol. Chem. 1918, Br. 36. — 14) *Adler*, Deutsch. Arch. f. inn. Med. **138**. — 15) *Heynsius* und *Campbell*, Pflügers Arch. **4**. — 16) *Auché*, C. r. de la soc. de biol. **64**, 297, und 299. — 17) *Hans Fischer*, Münch. med. Wochenschr. 1912, S. 2555—2556. — 18) *Auché*, l. c. — 19) *Brulé*, Les ictères. Monographie, Masson, Paris IIIième edit. 1922. — 20) *Adler*, Klin. Wochenschr. **1**, Nr. 51, S. 2506. — 21) *Derselbe*, ebendaselbst **1**, Nr. 36, S. 1788.

Über bakterielle Reduktion organisch gebundener Phosphorsäure.

Von

H. K. Barrenscheen und **H. A. Beckh-Widmanstetter,**
Assistenten der Institute.

(Aus dem medizinisch-chemischen und dem hygienischen Institut der Universität Wien.)

(Eingegangen am 12. Juni 1923.)

Die allgemein biologisch und auch vom gerichtschemischen Standpunkte interessante Frage der bakteriellen Reduktion der Phosphorsäure ist nach dem heutigen Stande unseres Wissens noch als kontrovers zu betrachten.

Spieckermann[1]) im *Lafar*schen Handbuch, *Kobert*[2]) in seinem Lehrbuch der Intoxikationen, *Kruse*[3]) in seiner allgemeinen Mikrobiologie bezeichnen übereinstimmend diese Frage noch als offen. Befaßt man sich mit den Originalarbeiten, so findet man eine Anzahl positiver Angaben in schroffem Gegensatz zu einer Reihe absolut negativer Ergebnisse.

Die ersten Angaben über das Auftreten von flüchtigen Phosphorverbindungen bei Fäulnisvorgängen rühren von *Selmi*[4]) her, welcher bei langsamer Fäulnis von Eiweiß und Eidottern das Auftreten einer flüchtigen, nicht mit Phosphorwasserstoff identischen Verbindung nachwies, die in Silberlösung aufgefangen, einen braunen Niederschlag lieferte. In breit angelegten, mit großen Mengen angestellten Versuchen von *Gautier* und *Étard*[5]), die sich mit der Analyse der bei der Fäulnis entstehenden Gase befaßten, wurde regelmäßig das Auftreten von Spuren von Phosphorwasserstoff bei Fäulnis von Rindfleisch und von Fischfleisch vermerkt, und zwar fanden sich diese Spuren, sobald die anfänglich einsetzende Zersetzung von stinkender Fäulnis abgelöst wurde. Angaben über die Technik des Nachweises fehlen allerdings in dieser Arbeit. Über positive Ergebnisse berichtigt auch *Barbieri*[6]), der Gehirnbrei mit Hefe bei 38 bis 45° gären ließ und schon in den ersten Stunden beträchtliche Mengen von Phosphor-

[1]) *Spieckermann*, Lafar **3**, 108.
[2]) *Kobert*, Intoxikationen, 2. Aufl., **2**, 1906.
[3]) *Kruse*, Allgemeine Mikrobiologie, 1910.
[4]) *Selmi*, Acad. de Bologna, Serie 3, 8.
[5]) *Gautier* und *Étard*, C. r. **94**, 1357, 1882.
[6]) *Barbieri*, C. r. **131**, 347, 1900.

wasserstoff gefunden haben will. Von deutschen Autoren hat *Marpmann*[1]) zuerst das Auftreten flüchtiger Phosphorverbindungen beim Faulen von Käse und bei Züchtung von verschiedenen Bakterien, unter anderem Tuberkelbazillen und Choleravibrionen, auf phosphorsäurehaltigen Nährböden unter anaeroben Bedingungen beschrieben. Die weitgehenden Schlußfolgerungen, die er auf Grund dieser Befunde entwickelte, haben wohl dazu beigetragen, daß seine Angaben auch dort, wo Beobachtung und Technik einwandfrei sind, nicht beachtet wurden. Auch *Stich*[2]) konnte bei der Fäulnis von Organbrei bei 37° und sodaalkalischer Reaktion in den Fäulnisgasen das Auftreten flüchtiger Phosphorverbindungen nachweisen, während ihm bei Beimpfung von verschiedenen Eiweißkörpern mit Bacterium coli und faulendem Pankreassaft dieser Nachweis nicht glückte. Wovon diese Reduktion der organisch gebundenen Phosphorsäure im einzelnen Falle abhing, konnte *Stich* nicht angeben. Über analoge Befunde wie *Stich* berichtet auch *Kreps*[3]) nach Versuchen an stark faulendem Gehirn. Bei der nicht unerheblichen Bedeutung, welche diese Frage speziell für forensische Zwecke besitzt — das allgemein angewendete Verfahren von *Blondlot-Dusart* wäre durch solche Befunde, wenn sie häufiger erhoben werden, in seiner Brauchbarkeit beträchtlich eingeschränkt —, fehlte es nicht an Nachprüfungen dieser Ergebnisse. Und die Zahl der Autoren, welche ausschließlich negative Resultate veröffentlichten, ist nicht gering. Schon 1862 berichteten *Fresenius* und *Neubauer*[4]) über Versuche mit faulenden Darmstücken und faulendem Blut, die mit Magnesium-Ammoniumphosphat versetzt waren. Es gelang ihnen nicht, bei 60 bis 70° mit Kohlensäure ein Silberphosphid bildendes Gas auszutreiben. Gegen die *Selmi*schen Angaben wendete sich speziell *Hollefreund*[5]), der mit Pferdehirn, das 4 Wochen „an der Luft" gelegen, und mit Eigelb, das bei einer 15° nicht übersteigenden Temperatur „an der Luft gestanden" hatte, negative Ergebnisse erhielt. *Klett*[6]), der die Frage der Reduktion durch Bakterien untersuchte und auf mit Natriumphosphit versetzten Nährböden züchtete, kam gleichfalls zu negativen Resultaten. Ein Leuchten der Kultur, das, wie er erwartete, von dem aus der reduzierten phosphorigen Säure herrührenden Phosphor stammen sollte, wurde von ihm nie beobachtet. *Hallasz*[7]) untersuchte die Brauchbarkeit der *Blondlot-Dusart*schen Probe und konnte sie an tierischen Organen, die am kühlen Orte der Fäulnis überlassen wurden, niemals positiv finden. Selbst in Fällen, in denen Phosphor zugesetzt war, fiel sie manchmal negativ aus. Auch *Fischer*[8]), der seine Substrate, meist Kartoffeln, nur wenige Tage faulen ließ, in einem Versuch nach Beimpfung mit Bacterium coli, erhielt nie flüchtige Phosphorverbindungen. Seine kurzdauernden Versuche sind kaum als Fäulnisversuche zu werten. *Yokote*[9]), der sich ausführlich mit der Frage beschäftigte, hat von vornherein alle Versuche, bei denen neben der Schwärzung von

---

[1]) *Marpmann*, Zentralbl. f. Bakter. **1**, **22**, 582, 1897.
[2]) *Stich*, ref. Chem. Zentralbl. 1901, **1**.
[3]) *Kreps*, zit. nach *Fischer*, l. c.
[4]) *Fresenius* und *Neubauer*, Zeitschr. f. analyt. Chem. **1**, **343**, **1862**.
[5]) *Hollefreund*, Diss. Erlangen 1890.
[6]) *Klett*, Zeitschr. f. Hyg. **32**, 155, 1900.
[7]) *Hallasz*, Zeitschr. f. anorg. Chem. **26**, 438, **1901**.
[8]) *Fischer*, Pflügers Arch. **97**, 601, 1903.
[9]) *Yokote*, Arch. f. Hyg. **50**, 118, 1904.

Silberpapier auch Bleipapier geschwärzt wurde, verworfen. Eine Anzahl anscheinend positiver Befunde fanden nach ihm ihre Erklärung durch Übergang von Phosphor aus dem Gummimaterial in das vorgelegte Bromwasser oder durch Bildung von Kieselsäure-Ammonmolybdat. Unter anaeroben Bedingungen wurde von ihm nur ein Versuch durchgeführt, der negativ war. Aus neuerer Zeit berichtet schließlich *Lemkes*[1]) anläßlich einer Überprüfung des *Blondlot-Dusart*schen Verfahrens über negative Ergebnisse von Versuchen, die mit menschlichem Gehirn in verschiedenen Zersetzungsstadien angestellt wurden.

Diese Widersprüche und die daraus hervorgegangenen Bedenken gegen das Verfahren von *Blondlot-Dusart* veranlaßten *Ehrenfeld* und *Kulka*[2]) zu einer Modifikation desselben, durch welche nur die gebildete phosphorige bzw. unterphosphorige Säure nachgewiesen werden sollte. Im Laufe dieser Untersuchungen angestellte Faulversuche mit Kaninchenorganen, die nach Durchtränkung mit Natriumphosphat oberflächlich vergraben und mehrere Monate in der kalten Jahreszeit der Fäulnis überlassen wurden, hatten, nach *Mitscherlich* und *Ehrenfeld-Kulka* untersucht, ein negatives Ergebnis. Dagegen konnte *Kulka*[3]) in den aus dem Faulraum einer Kläranlage aufsteigenden Gasen einwandfrei flüchtige Phosphorverbindungen nachweisen. In etwa 6 Litern der Gase wurde Phosphor entsprechend 2,1 mg Magnesiumpyrophosphat gefunden. Anaerob durchgeführte Versuche, in welchen Bacillus putrificus in Reinkultur bei 37° auf Gehirn und Eigelb gezüchtet wurde, ergaben in den Fäulnisgasen einwandfrei flüchtige Phosphorverbindungen.

Überblickt man diese Angaben der Literatur, so findet man in den positiven und negativen zahlreiche Widersprüche. Teils ist die Fragestellung eine vollkommen verfehlte; fast durchweg läßt sich aber, abgesehen von Bedenken gegen die Methode des Nachweises, der Einwand erheben, daß die Bedingungen der Fäulnis in den einzelnen sich widersprechenden Arbeiten ganz verschieden gewesen sind, so daß daraus ein Für und Wider nicht abzuleiten ist.

Den unmittelbaren Anlaß für uns, das Thema wieder aufzugreifen, gab eine gerichtschemische Untersuchung, die der eine von uns gemeinsam mit *H. Jansch* am medizinisch-chemischen Institut durchführte. Es handelte sich um einen plötzlichen Todesfall, bei dem der Verdacht eines Giftmordes nicht ausgeschlossen war. Weder aus der Krankheitsgeschichte noch aus dem Obduktionsprotokoll konnte der geringste Anhaltspunkt für eine Phosphorvergiftung gewonnen werden. Die Untersuchung nach *Mitscherlich* verlief denn auch negativ. Die Probe nach *Blondlot-Dusart* gab jedoch eindeutig positives Ergebnis. Der Fall klärte sich im weiteren Verlauf der Untersuchung als eine Arsenvergiftung mit ungewöhnlich großen Mengen des Giftes auf. Der positive Ausfall der *Blondlot-Dusart*schen Prüfung legte den Ge-

---

[1]) *Lemkes*, ref. Chem. Zentralbl. 1917, 1, 604. Über die Technik der Faulversuche ist aus dem Referat nichts zu ersehen.

[2]) *Ehrenfeld* und *Kulka*, Hoppe-Seyler 59, 53; 68, 315.

[3]) *Kulka*, Zentralbl. f. Bakter., Abt. 1, 61, 336, 1912.

danken nahe, daß es sich hier um bakterielle Reduktion organisch gebundener Phosphorsäure handeln könnte. Tatsächlich waren die Leichenteile während der größten Sommerhitze infolge falscher Adressierung durch fast 2 Wochen auf dem Postamt liegen geblieben und befanden sich bei der Übernahme in hochgradiger Fäulnis, speziell das in einem Glase mit eingeriebenem Glasstopfen, das überdies mit Pergament überbunden war, eingesendete Leichenblut war in hochgradiger Zersetzung, beim Öffnen des Glases entwich unter Druck ein stark nach Schwefelwasserstoff riechendes Gas. Den Nachweis, daß in dem vorliegenden Falle der Ausfall der *Blondlot-Dusart*schen Probe tatsächlich durch bakterielle Reduktion bedingt sein konnte, lieferten uns Versuche, die wir mit Rinderblut anstellten.

Frisches, aus dem Schlachthause bezogenes Rinderblut, das allerdings nicht keimfrei war, wurde in Portionen von 150 ccm in sterile Kolben von 200 ccm abgefüllt und jeder Kolben mit je fünf Tropfen des Leichenblutes beimpft. Zwei der Kolben wurden mit Paraffin (hoch) überschichtet und je ein überschichtetes und nicht überschichtetes Kolbenpaar im Brutschrank bei 37 und 22° gehalten. Daneben wurden noch Kontrollen von nicht beimpftem Rinderblut unter den gleichen Bedingungen aufgestellt. In den anaerob gehaltenen beimpften Kolben trat bald eine intensive Gasentwicklung auf, doch wurde von einer Untersuchung der Gase Abstand genommen. Nach 38 Tagen wurden zunächst 50 ccm des bei 37° anaerob gehaltenen Blutes nach *Blondlot-Dusart* direkt verarbeitet. Das zur Wasserstoffentwicklung verwendete Zink und die Schwefelsäure waren geprüft und einwandfrei. Die Apparatur war im Dunkelzimmer aufgestellt. In der Silbernitratvorlage bildete sich bald ein reichlicher schwarzbrauner Niederschlag, dessen weitere Verarbeitung nach zweiwöchiger Entwicklung in typischer Weise erfolgte. Etwa entwickelter Schwefelwasserstoff wurde durch Vorschalten eines Röhrchens mit festem Kali und Natronkalk abgefangen. Es zeigte sich deutliche Smaragdgrünfärbung des Kegels der Wasserstoffflamme, die durch Andrücken eines Porzellanplättchens noch schöner in Erscheinung trat. Das entweichende Gas zeigte den typischen Lauchgeruch des Phosphorwasserstoffs. Ebenso wie die bei 37° gehaltene anaerobe Probe zeigte auch die bei 22° gehaltene anaerobe einen positiven, allerdings schwächeren Ausfall. Die aerob gehaltenen Proben und die Kontrollen hatten, auf gleiche Weise verarbeitet, ein vollständig negatives Ergebnis.

Damit war einwandfrei nachgewiesen, daß Bakterien unter anaeroben Bedingungen bei entsprechender Temperatur organisch gebundene Phosphorsäure so weit reduzieren können, daß eine positive Blondlot-Dusartsche Reaktion erhalten wird. Die vielfach angefochtenen positiven Angaben der älteren Literatur finden durch unsere Befunde eine Bestätigung.

Gleichzeitig war aber auch der Weg gewiesen, die ganze Frage *systematisch* durchzuarbeiten.

Zur weiteren Aufklärung der Bedingungen dieser Reduktion wurde zunächst an die Reinkultur der im verwendeten Fäulnisgemisch vorhandenen Bakterien geschritten. Durch aerobe Züchtung wurden zwei Stämme isoliert, von denen der eine Stamm L als Proteus Zenckeri bestimmt wurde, der zweite Stamm M, der Gelatine verflüssigt, zur Proteusgruppe zuzuzählen ist, obwohl er in einigen Punkten von dem typischen Bacterium vulgare abweicht. Keimzählungen ergaben, daß er unter aeroben Bedingungen im Blute nur dreimal dichter wuchs als bei Sauerstoffabschluß. Mit beiden Stämmen wurden unter gleichen Bedingungen wie oben Versuche an unter sterilen Kautelen durch Venae punctio gewonnenem Menschen- und Hundeblut durchgeführt. Ihr Ergebnis war vollständig negativ. Wir können also vorläufig feststellen, daß die von uns untersuchten *fakultativen* Anaerobier allein zur Reduktion der Phosphorsäure *nicht* befähigt sind. Versuche mit den obligaten Anaerobiern aus unseren Kulturen, sowie mit anderen, deren Reduktionsvermögen sonst bekannt ist, wurden in Angriff genommen. Auch der Frage des symbiotischen Zusammenwirkens, das *Kämmerer*[1]) bei der Reduktion des Hämatins zu Hämatoporphyrin durch Darmbakterien feststellen konnte, soll entsprechendes Augenmerk zugewendet werden. Mit Rücksicht auf die praktischen Folgerungen sehen wir uns jedoch veranlaßt, das vorliegende Ergebnis unserer Arbeit schon jetzt zu veröffentlichen.

---

[1]) *Kämmerer*, 35. Kongreß f. inn. Med. Wien 1923.

Bestimmung von Aminosäuren mittels konduktometrischer Titration.

Von

Erik M. P. Widmark und **Erik L. Larsson.**

(Aus dem medizinisch-chemischen Institut der Universität Lund.)

(Eingegangen am 13. Juni 1923.)

Mit 8 Abbildungen im Text.

In letzterer Zeit wurde von mehreren Seiten die praktische Verwendbarkeit der konduktometrischen Titration in der Maßanalyse hervorgehoben. In der Azidi- und Alkalimetrie wurde diese Methode am eingehendsten von *Kolthoff*[1]) studiert. Dieser betont die Bedeutung derselben besonders in solchen Fällen, wo gute Resultate mit Indikatoren nicht erreichbar sind.

In der Biochemie hat diese Titrationsmethode bisher sehr wenig Verwendung gefunden. Es schien uns sehr wahrscheinlich, daß sie hier besonders brauchbar sein könnte. Gerade in Anbetracht dessen, daß man in der Biochemie Indikatoren wegen der Farbe der Lösungen, Anwesenheit von schwachen Säuren, amphoteren Verbindungen und ähnlichem oft nicht verwenden kann. Wir haben deshalb die Verwendbarkeit der konduktometrischen Titration innerhalb einiger verschiedenen Gebiete der Biochemie zu studieren begonnen.

Zweck der vorliegenden Untersuchung ist, zu prüfen, ob man auf diese Weise Aminosäuren bestimmen kann. Wie sich aus folgendem ergibt, ist dies auch gelungen. Man kann durch Titration mit Alkali und unter Verwendung der Leitfähigkeit als Indikator diese Säuren bequem und mit zufriedenstellender Genauigkeit quantitativ bestimmen.

Mit der Methode kann man auch eine Proteolyse auf die gleiche Weise verfolgen, wie z. B. mit einer Formoltitration.

Eine Besprechung der Theorie der Methode dürfte sich ihrer hinreichenden Durcharbeitung halber erübrigen. Wir begnügen uns deshalb damit, den Leser auf die oben genannte Arbeit von *Kolthoff* zu verweisen.

---

[1]) *Kolthoff*, Zeitschr. f. anorgan. u. allgem. Chem. **111, 112,** 1920. und anderen Stellen.

Es sind jedoch schon früher einige bemerkenswerte Versuche angestellt worden, durch Messung der Veränderung der Leitfähigkeit beim Zusatz von Lauge oder Säure eine Vorstellung vom Molekulargewicht amphoterer Verbindungen zu erhalten.

Im Jahre 1895 maß *J. Sjöquist*[1]) auf besonders sorgfältige Weise und unter entsprechender Rücksichtnahme auf störende Fehlerquellen die Veränderung, die eine Lösung von Ovalbumin hinsichtlich ihrer Leitfähigkeit erleidet, wenn ihr verschiedene Mengen Säure zugesetzt werden. Er faßte die Veränderung der Leitfähigkeit als eine Neutralisationserscheinung auf. Das Protein verhält sich also Säuren gegenüber wie eine schwache Base. Unter Berücksichtigung der vorhandenen Hydrolyse berechnete er das Molekulargewicht des Ovalbumins zu 800 oder 820.

Später hat *W. Neumann*[2]) mit einer ähnlichen Untersuchungsmethode, auf Grund *Siegfrieds* Studien, den basischen und sauren Charakter in reiner Form dargestellter Peptone ermittelt. Er kommt zu der Auffassung, daß Pepsinfibrinpepton und Glutinpepton wahrscheinlich dreibasische Säuren und zweisäurige Basen, während die beiden entsprechenden Antipeptone zweibasische Säuren und einsäurige Basen sind. Das Resultat muß vielleicht als etwas unsicher betrachtet werden, besonders deshalb, weil der Beweis für die chemische Individualität dieser Peptone noch nicht als sicher erbracht angesehen werden kann. Weit wichtiger für die in vorliegendem Aufsatze behandelte Frage sind die von *Neumann* durchgeführten Bestimmungen der Molekulargewichte des Asparagins und Glykokolls. Während die totalen Natrium- bzw. Chlorkonzentrationen konstant gehalten wurden, veränderte *Neumann* die Menge der Aminosäure. Er konnte dann aus der Kurve, die aus den Messungen der Leitfähigkeit der verschiedenen Lösungen erhalten wurde, die Molekulargewichte der Säuren berechnen. Hierbei zeigte es sich, daß die Versuche mit Lauge sicherere Resultate als die mit Säure ergaben, da bei den letzteren die Hydrolyse die Deutung unsicher machte.

Trotzdem diese nun besprochenen Versuche ihrem theoretischen Inhalte nach mit dem, was wir eine konduktometrische Titration nennen, übereinstimmen, wurde durch sie doch nicht die praktisch verwendbare Methode zur Bestimmung genannter Verbindungen erreicht.

Methodik.

Die Leitfähigkeit der Lösungen wurde auf die gewöhnliche Weise in der *Wheatstone*schen Brücke mit Wechselstrom und Telephon bestimmt. Hierbei wurde eine Tauchelektrode von ungefähr dem Aussehen verwendet, wie sie Abb. 329 in *Ostwald-Luther*, Physik.-chemische Messungen, 3. Aufl., S. 469 zeigt. Die Kapazität der Elektrode war etwa 0,28. Da es sich hier nur um die relative Veränderung der Leitfähigkeit während des Versuches handelte, war eine genaue Kenntnis der Kapazität der Elektrode überflüssig. Desgleichen wurde nicht für eine allen Versuchen gemeinsame Temperatur gesorgt, sondern das die zu titrierende Lösung enthaltende Becherglas wurde ganz einfach

[1]) *Sjöquist*, Skand. Arch. f. Physiol. 5, 177, 1895.

[2]) *Neumann*, Zeitschr. f. physiol. Chem. 45, 216, 1905.

in ein kleines Wasserbad von Zimmertemperatur eingesenkt. Die Temperatur der Lösung hielt sich während des Verlaufes der Titration genügend konstant. Der Vergleichswiderstand betrug bei den meisten Versuchen 200 Ohm und konnte gewöhnlich während der ganzen Titration beibehalten werden. Die abgelesenen Werte wurden auf die relative Leitfähigkeit $\frac{a}{1000-a}$ umgerechnet.

Das Volumen der Lösungen betrug gewöhnlich 50 bis 60 ccm, ihre Konzentrationen waren 0,01 bis 0,03 molar. Damit sich das Volumen der Lösung während der Titration nur wenig verändere, wurde beim Titrieren eine etwa normale, kohlensäurefreie Natronlauge verwendet. Diese wurde in die Versuchslösung in Portionen von 0,1 bis 0,2 ccm aus einer in 0,02 ccm geteilten Pipette eingetropft. Nach jedem Zusatz wurde die Lösung mit der Elektrode sorgfältig umgerührt und ihre Leitfähigkeit bestimmt.

Die so erhaltenen Werte von $\frac{a}{1000-a}$ wurden auf Millimeterpapier in einem Koordinatensystem mit der relativen Leitfähigkeit als Ordinate und der zugesetzten Laugenmenge als Abszisse eingetragen.

Für einbasische Aminosäuren erhält man, wie aus den Abbildungen ersichtlich, zwei sich schneidende gerade Linien. Der Schnittpunkt, der mit einer Genauigkeit von ungefähr $\frac{1}{2}$ mm (0,01 ccm) abgelesen wurde, gibt die zur Neutralisation der Säure notwendige Menge Lauge an. Zweibasische Säuren ergeben zwei Schnittpunkte, die die Neutralisation der beiden sauren Gruppen vorstellen.

In den Fällen, wo die durch Punkte bestimmten Linien in der Nähe des Schnittpunktes von der Geraden abweichen, wurden die geraden Teile der Linien verlängert und deren Schnittpunkt als der wirkliche Neutralisationspunkt betrachtet. Dies ist jedoch selten notwendig.

Bei unserer Prüfung der Methode auf die Verwendbarkeit derselben zur Titration verschiedener Aminosäuren, haben wir von diesen alle uns erreichbaren, biologisch vorkommenden untersucht. Mehrere standen uns nur in so geringen Mengen zur Verfügung, daß eine sorgfältigere Reinigung derselben nicht in Frage hat kommen können. Die mit diesen erhaltenen Resultate dürfen daher nicht als ein Kriterium der Genauigkeit der Methode betrachtet werden, da uns der Reinheitsgrad der Präparate nicht genügend bekannt war. Nur was das Glykokoll anbelangt, haben wir die Messungen mit einem umkristallisierten Präparat von *Kahlbaum* ausgeführt. Dieser Versuch findet sich samt Belegen für die Reinheit des Präparates auf S. 287.

Von Monoaminosäuren haben wir folgende geprüft:

Glykokoll (*Kahlbaum*), Alanin (*Kahlbaum*), Isoserin (*Schuchardt*), Aminonormalvaleriansäure (*Schuchardt*), Leucin (*Kahlbaum*), Norleucin

(*Schuchardt*), Tryptophan (*Hoffmann-La Roche*), Asparaginsäure, Asparagin (*Kahlbaum*), Glutaminsäure (*Schuchardt*), Tyrosin (*Merck*).

Von Hexonbasen ist uns nur Arginin (*Hoffmann-La Roche*) in freier Form zugänglich gewesen. Lysin (*Hoffmann-La Roche*) und Histidin (*Schuchardt*) wurden als Chlorhydrate titriert.

Von Peptiden haben wir bisher nur Leucylglycin (*Kahlbaum*) geprüft.

Tabelle I.

Titration von 19,86 ccm n/10 Glykokoll mit n NaOH (Abb. 1).

NaOH ccm	$\frac{a}{1000-a}$	NaOH ccm	$\frac{a}{1000-a}$
0,2	0,129	1,3	0,761
0,3	0,191	1,5	0,866
0,4	0,248	1,7	0,965
0,5	0,311	1,9	1,079
0,6	0,369	2,1	1,252
0,7	0,427	2,2	1,375
0,8	0,482	2,3	1,500
0,9	0,541	2,4	1,625
1,0	0,595	2,8	2,145
1,1	0,650	3,0	2,401
1,2	0,709		

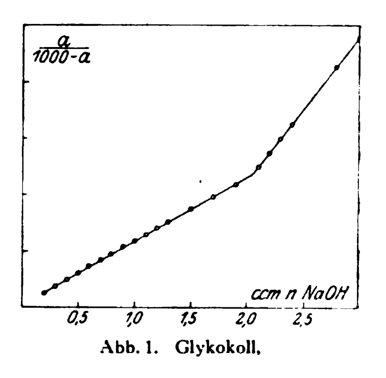


Abb. 1. Glykokoll.

Neutralisationspunkt berechnet: 1,99 Millimol; gefunden: 2,02 Millimol.

Tabelle II.

Titration von 19,86 ccm n/10 α-Alanin mit n NaOH.

NaOH ccm	$\frac{a}{1000-a}$
0,8	0,361
1,6	0,704
2,2	1,088
2,6	1,506

Äquivalenzpunkt berechnet: 1,99 Millimol; gefunden: 2.05 Millimol.

Tabelle III.

Titration von 0,1026 g Isoserin mit n NaOH.

NaOH ccm	$\frac{a}{1000-a}$	NaOH ccm	$\frac{a}{1000-a}$	NaOH ccm	$\frac{a}{1000-a}$
0,1	0,0737	0,8	0,546	1,5	1,663
0,2	0,148	0,9	0,618	1,6	1,859
0,3	0,213	1,0	0,716	1,7	2,050
0,4	0,282	1,1	0,882	1,8	2,272
0.5	0,346	1,2	1,077	1,9	2,448
0,6	0,412	1,3	1,277	2,0	2,623
0,7	0,476	1,4	1,464		

Berechnet: 0,98 Millimol; gefunden: 0,97 Millimol.

Tabelle IV.

Titration von 0,1396 g Amino-n-valeriansäure mit n NaOH.

NaOH ccm	$\frac{a}{1000-a}$	NaOH ccm	$\frac{a}{1000-a}$	NaOH ccm	$\frac{a}{1000-a}$
0,5	0,346	1,1	0,787	1,7	1,835
0,6	0,419	1,2	0,877	1,8	2,047
0,7	0,491	1,3	1,005	1,9	2,289
0,8	0,559	1,4	1,193	2,0	2,498
0,9	0,636	1,5	1,401		
1,0	0,710	1,6	1,622		

Berechnet: 1,19 Millimol; gefunden: 1,28 Millimol.

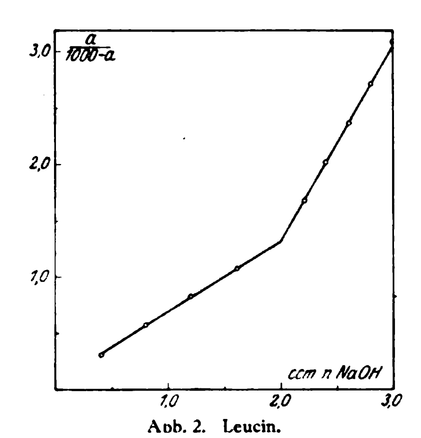


Abb. 2. Leucin.

Tabelle V.

Titration von 19,86 ccm n/10 Leucin mit n NaOH (Abb. 2).

NaOH ccm	$\frac{a}{1000-a}$	NaOH ccm	$\frac{a}{1000-a}$
0,4	0,306	2,4	2,030
0,8	0,580	2,6	2,367
1,2	0,835	2,8	2,731
1,61	1,079	3,0	3,098
2,2	1,688		

Berechnet: 1,99 Millimol; gefunden: 2,00 Millimol.

Tabelle VI.

Titration von 0,0786 g Norleucin mit n NaOH.

NaOH ccm	$\frac{a}{1000-a}$	NaOH ccm	$\frac{a}{1000-a}$	NaOH ccm	$\frac{a}{1000-a}$
0,2	0,135	0,5	0,324	0,8	0,707
0,3	0,197	0,6	0,406	0,9	0,890
0,4	0,262	0,7	0,528	1,0	1,079

Berechnet: 0,60 Millimol; gefunden: 0,64 Millimol.

Tabelle VII.

Titration von 0,1097 g l-Tryptophan mit 1,110 n NaOH.

NaOH ccm	$\frac{a}{1000-a}$	NaOH ccm	$\frac{a}{1000-a}$
0,1	0,084	0,6	0,673
0,2	0,165	0,7	0,993
0,3	0,246	0,8	1,189
0,4	0,327	0,9	1,453
0,5	0,445	1,0	1,700

Berechnet: 0,58 Millimol; gefunden: 0,55 Millimol.

Tabelle VIII. Asparaginsäure (*Kahlbaum*, umkristallisiert).
Titration von 0,1238 g mit 1,11 n NaOH (Abb. 3).

NaOH ccm	$\frac{a}{1000-a}$	NaOH ccm	$\frac{a}{1000-a}$	NaOH ccm	$\frac{a}{1000-a}$
0,2	0,145	1,2	0,615	2,2	1,635
0,4	0,210	1,4	0,733	2,4	1,887
0,6	0,286	1,6	0,882	2,6	2,142
0,8	0,369	1,8	1,115	2,8	2,389
1,0	0,496	2,0	1,373	3,0	2,636

Berechnet: 0,89 Millimol; gefunden: 1. 0,83 Millimol, 2. 0,88 Millimol.

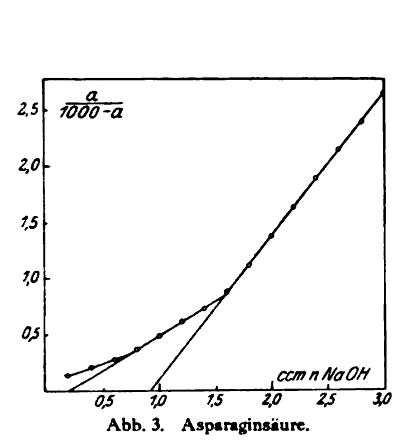


Abb. 3. Asparaginsäure.

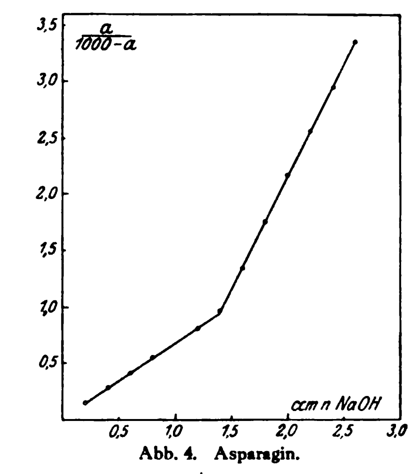


Abb. 4. Asparagin.

Tabelle IX. Titration von 0,2010 g Asparagin mit n NaOH (Abb. 4).

NaOH ccm	$\frac{a}{1000-a}$	NaOH ccm	$\frac{a}{1000-a}$	NaOH ccm	$\frac{a}{1000-a}$
0,2	0,151	1,4	0,973	2,4	2,957
0,4	0,287	1,6	1,358	2,6	3,365
0,6	0,423	1,8	1,764	3,0	4,128
0,8	0,555	2,0	2,175		
1,2	0,812	2,2	2,571		

Berechnet: 1,52 Millimol; gefunden: 1,42 Millimol.

Tabelle X. Titration von 0,1418 g Glutaminsäure mit 1,110 n NaOH.

NaOH ccm	$\frac{a}{1000-a}$	NaOH ccm	$\frac{a}{1000-a}$	NaOH ccm	$\frac{a}{1000-a}$
0,1	0,315	0,9	1,000	1,7	1,997
0,2	0,387	1,0	1,119	1,8	2,235
0,3	0,470	1,1	1,229	1,9	2,520
0,4	0,549	1,2	1,348	2,0	2,767
0,5	0,636	1,3	1,461	2,1	3,022
0,6	0,717	1,4	1,582	2,2	3,288
0,7	0,802	1,5	1,693	2,31	3,583
0,8	0,890	1,6	1,824		

Berechnet: 0,96 Millimol; gefunden: 1. 0,83 Millimol, 2. 0,92 Millimol.

Tabelle XI.

Titration von 0,0384 g Tyrosin mit 0,201 n NaOH (Abb. 5).

NaOH ccm	$\frac{a}{1000-a}$	NaOH ccm	$\frac{a}{1000-a}$	NaOH ccm	$\frac{a}{1000-a}$
0,2	0,060	1,2	0,329	2,2	0,739
0,4	0,109	1,4	0,395	2,4	0,858
0,6	0,160	1,6	0,468	2,61	0,986
0,8	0,211	1,8	0,547	2,8	1,113
1,0	0,267	2,0	0,626	3,0	1,244

Berechnet: 0,21 Millimol; gefunden: erster Knickpunkt entspricht 0,22 Millimol, zweiter Knickpunkt entspricht 0,21 Millimol.

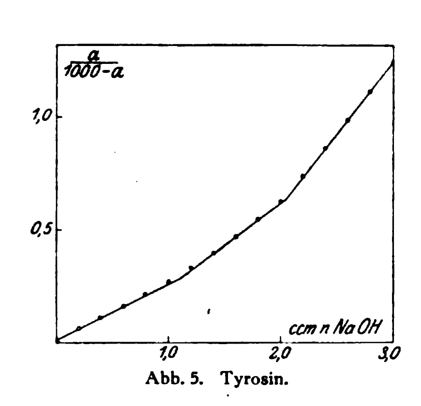


Abb. 5. Tyrosin.

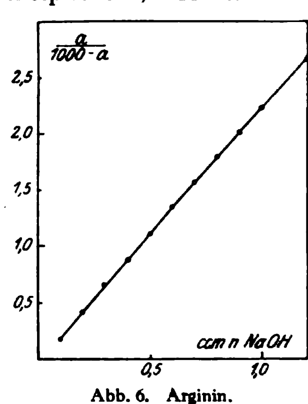


Abb. 6. Arginin.

Sämtliche geprüften Monoamino-monocarbonsäuren zeigen einen gut markierten Knick an der Stelle der vollständigen Neutralisation der Carboxylgruppe. Die Hydrolyse wirkt nicht störend. Überhaupt weisen sich diese Verbindungen bei der Titration als schwache Säuren ohne amphoteren Charakter. Ihre Aminogruppen wirken auf das Titrationsresultat nicht störend ein. Die Werte, die vor der Neutralisation der Säure erhalten werden, liegen auf einer aufsteigenden geraden Linie; irgend ein Minimum der Leitfähigkeit wird nicht passiert.

Wie bereits erwähnt, zeigen die beiden zweibasischen Säuren, Asparaginsäure und Glutaminsäure, abweichende Verhältnisse, indem diese zwei Knickpunkte aufweisen, je einen für die Neutralisation der beiden Carboxylgruppen. Der letztere ist jedoch deutlicher markiert und gibt sicherere Werte als der erste, der gewöhnlich etwas zu niedrig liegt. Asparagin verhält sich typisch wie eine einbasische Säure.

Bei der Titration von Tyrosin, welche der geringen Löslichkeit dieser Säure halber mit 0,201 n Natronlauge vorgenommen wurde, werden auch zwei Knicke erhalten. Die Säure erweist sich also als zweibasisch; der erste Knick wird bei der Neutralisation der Carboxylgruppe, der zweite bei der Neutralisation der Phenolgruppe erhalten.

Tabelle XII.

Titration von 1. 0,0922 g und 2. 0,0722 g Arginin mit n NaOH (Abb. 6).

NaOH ccm	$\frac{a}{1000-a}$ 1	2	NaOH ccm	$\frac{a}{1000-a}$ 1	2	NaOH ccm	$\frac{a}{1000-a}$ 1	2
0,1	0,185	0,356	0,5	1,113	1,225	0,9	2,018	2,186
0,2	0,422	0,462	0,6	1,351	1,472	1,0	2,240	2,422
0,3	0,658	0,716	0,7	1,570	1,716	1,2	2,673	—
0,4	0,885	0,971	0,8	1,799	1,949			

Tabelle XIII. Titration von 0,1080 g Histidinchlorhydrat mit 1,110 n NaOH.

NaOH ccm	$\frac{a}{1000-a}$	NaOH ccm	$\frac{a}{1000-a}$	NaOH ccm	$\frac{a}{1000-a}$
0,1	0,498	0,64	0,576	1,20	1,072
0,2	0,482	0,70	0,599	1,30	1,204
0,24	0,489	0,74	0,616	1,40	1,335
0,30	0,497	0,80	0,639	1,50	1,466
0,34	0,502	0,84	0,656	1,60	1,607
0,40	0,510	0,90	0,687	1,70	1,733
0,44	0,515	0,94	0,721	1,80	1,868
0,50	0,525	1,00	0,791	1,90	1,997
0,54	0,536	1,04	0,848	2,00	2,129
0,60	0,559	1,10	0,928		

Berechnet für Monochlorhydrat: 0,52 Millimol; gefunden aus letzter Knickung: 0,52 Millimol.

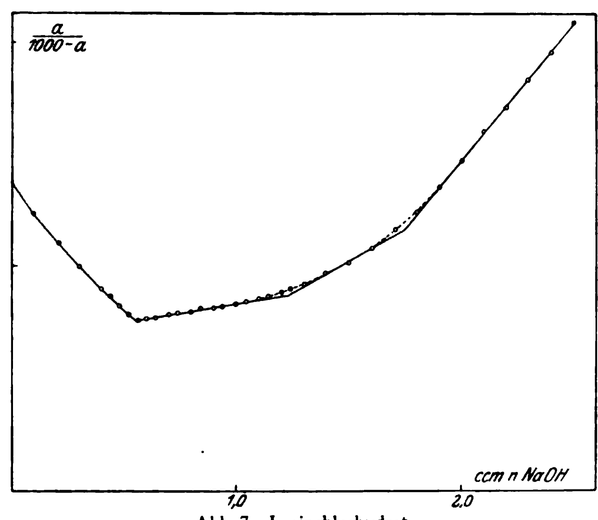


Abb. 7. Lysinchlorhydrat.

Arginin, die einzige Hexonbase, die uns in freier Form zur Verfügung stand, ist eine Base von solcher Stärke, daß dieselbe durch konduktive Titration mit Alkali nicht nachgewiesen werden kann.

Die Titrationskurve wird eine gerade Linie; wird überhaupt eine Krümmung sichtbar, so geht diese in entgegengesetzter Richtung, so wie wir es bei der Titration von schwachen Säuren zu sehen gewohnt sind.

Lysin und Histidin wurden als bzw. Di- und Monochlorhydrat titriert. Mit Alkali ergibt hierbei Lysin drei Knickpunkte, von denen die beiden ersten (Abb. 7) der Freimachung der beiden Aminogruppen entsprechen, während der letzte die Neutralisation der Carboxylgruppe anzeigt. Nur der erste Knick ist ganz deutlich, während die anderen zwei zum großen Teil durch die Hydrolyse verdeckt werden, so daß die Bestimmung der Lage derselben erschwert wird. Histidinchlorid gibt nur mit der Laugenlinie einen deutlichen Knick. Die Lage desselben kann gut bestimmt werden.

Mit Ausnahme von Arginin geben also alle untersuchten Aminosäuren (Prolin und Oxyprolin finden sich nicht darunter) bei konduktiver Titration mit Alkali einen deutlichen Knick mit der Laugenlinie. Lysin ist hierbei am schwersten bestimmbar.

Um die Genauigkeit zu demonstrieren, mit der die Bestimmung dieser Aminosäuren, falls sie in reiner wässeriger Lösung vorliegen, geschehen kann, haben wir eine Serie Titrationen mit reinem Glykokoll ausgeführt (*Kahlbaums* Präparat, einmal umkristallisiert, exsikkatortrocken. Kjeldahl-Analyse: 18,63% N, ber. 18,66).

Tabelle XIV.

Glykokoll. Alkalititration.

Berechnet Millimol	Gefunden Millimol	Differenz Millimol
0,823	0,84	+ 0,017
1,306	1,32	+ 0,014
1,384	1,37	— 0,014
1,908	1,91	+ 0,002
2,683	2,66	— 0,023

Die Tabelle zeigt zufriedenstellende Übereinstimmung zwischen den berechneten und beobachteten Werten.

In den folgenden Tabellen wird schließlich über die Titration von Leucyl-glycin, sowie über Mischungen von Aminosäuren berichtet.

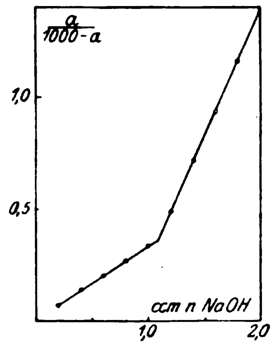


Abb. 8. Leucyl-glycin.

Tabelle XV.

Titration von 0,1944 g Leucyl-glycin (*Kahlbaum*) mit n NaOH (Abb. 8).

NaOH ccm	$\frac{a}{1000-a}$	NaOH ccm	$\frac{a}{1000-a}$
0,2	0,075	1,2	0,493
0,4	0,142	1,4	0,716
0,6	0,208	1,6	0,940
0,8	0,271	1,8	1,165
1,0	0,342	2,0	1,386

Berechnet: 1,03 Millimol; gefunden: 1,09 Millimol.

Tabelle XVI.

Titration von 0,0946 g Alanin und 0,0681 g Glykokoll mit 1,110 n Natronlauge.

NaOH ccm	$\frac{a}{1000-a}$	NaOH ccm	$\frac{a}{1000-a}$	NaOH ccm	$\frac{a}{1000-a}$
0,1	0,104	0,7	0,648	1,8	1,654
0,2	0,198	0,9	0,814	2,0	2,064
0,3	0,290	1,0	0,900	2,2	2,569
0,4	0,378	1,2	1,062	2,4	3,041
0,5	0,475	1,4	1,230	2,6	3,527
0,6	0,557	1,6	1,405	2,8	4,011

Berechnet: 1,97 Millimol Alanin + Glykokoll;
gefunden: 2,00 Millimol Alanin + Glykokoll.

Tabelle XVII.

Titration von einem Gemisch von 0,0763 g Glykokoll und 0,0591 g Arginin mit 1,111 n Natronlauge.

NaOH ccm	$\frac{a}{1000-a}$	NaOH ccm	$\frac{a}{1000-a}$
0,2	0,278	1,2	1,625
0,4	0,447	1,4	2,159
0,6	0,633	1,6	2,691
0,8	0,824	1,8	3,215
1,0	1,115	2,0	3,731

Berechnet: 1,02 Millimol Glykokoll; gefunden: 1,04 Millimol Glykokoll.

Tabelle XVIII.

Titration von 0,0743 g Leucyl-glycin und 0,0541 g Glykokoll mit 1,110 n Natronlauge.

NaOH ccm	$\frac{a}{1000-a}$	NaOH ccm	$\frac{a}{1000-a}$	NaOH ccm	$\frac{a}{1000-a}$
0,1	0,112	0,8	0,766	1,5	2,288
0,2	0,199	0,9	0,869	1,6	2,548
0,3	0,292	1,0	1,004	1,7	2,826
0,4	0,385	1,1	1,224	1,8	3,089
0,5	0,480	1,2	1,475	1,9	3,348
0,6	0,571	1,3	1,757	2,0	3,612
0,7	0,668	1,4	2,039		

Berechnet: 1,12 Millimol Glykokoll + Leucyl-glycin;
gefunden: 1,13 Millimol Glykokoll + Leucyl-glycin.

Es zeigt sich also, daß das verwendete Dipeptid sehr gut konduktometrisch bestimmt werden kann. Es verhält sich wie eine Monocarbonsäure. Leider haben wir nicht Gelegenheit gehabt, Peptide mit Diaminosäuren zu untersuchen.

Bei der Titration von Aminosäuremischungen erhält man ein Maß für die Menge der in der Lösung sich befindenden sauren Gruppen

(Carboxyl- und Phenolgruppen). Eine Bestimmung des Verhältnisses zwischen den vorhandenen verschiedenen Aminosäuren gelingt dagegen nicht. In den untersuchten Fällen wurde nur ein durch gerade Linien gebildeter Knick erhalten. Wichtig ist, daß gleich wie früher die dem Arginin entsprechende Carboxylmenge nicht in das Bestimmungsresultat einbezogen wird (Tabelle XVII).

Zusammenfassung.

1. Die Verfasser untersuchen die Möglichkeit, Aminosäuren durch konduktometrische Titration mittels Lauge zu bestimmen.

2. Die Aminosäuren verhalten sich bei konduktometrischer Titration mit Lauge wie schwache Säuren ohne amphoteren Charakter. Deshalb können sie auf diese Weise gewöhnlich mit genügender Sicherheit titriert werden.

3. Von allen untersuchten biologisch vorkommenden Aminosäuren entzieht sich nur Arginin der Ermittelung.

4. Sowohl bei der Titration von Dipeptiden (Leucyl-glycin) als auch von Aminosäuremischungen wird ein zufriedenstellender Wert für die Menge der in der Lösung befindlichen sauren Gruppen erhalten. Die dem Arginin entsprechende Carboxylgruppe wird jedoch nicht mitbestimmt.

Über Sulfatase.

Von

Carl Neuberg.

I. Mitteilung:

Über die enzymatische Spaltung der Phenolätherschwefelsäure.

Von

K. Kurono.

(Aus dem Kaiser Wilhelm-Institut für experimentelle Therapie u. Biochemie in Berlin-Dahlem.)

Im Jahre 1876 machte *Eugen Baumann*[1]) die überraschende Beobachtung, daß organische Abkömmlinge der Schwefelsäure im Stoffwechsel eine erhebliche Rolle spielen. Er fand, daß Schwefelsäureverbindungen des Phenols und Parakresols Bestandteile des normalen Harns aller Tiere sind. Die anfangs[1]) für Sulfosäuren gehaltenen Substanzen wurden bald als Schwefelsäureester erkannt, und zwar als saure Ester der allgemeinen Formel $R . O . SO_3H$.

Die Entstehungsweise dieser Verbindungen konnte gleichzeitig *E. Salkowski*[2]) auf Grund seiner bekannten Untersuchungen über die Eiweißfäulnis deuten. Eine wesentliche Quelle der genannten Schwefelsäureester ist das im Darmkanal aus dem Tyrosinkomplex der Proteine durch Mikroben erzeugte Phenol bzw. Parakresol. Die Phenole paaren sich im Organismus mit Schwefelsäure. Später ergab sich, daß eine große Anzahl von Substanzen der carbo- und heterocyklischen Reihen imstande ist, solche Ätherschwefelsäuren-Synthesen einzugehen. Körper mit phenolischem Hydroxyl werden unmittelbar mit Schwefelsäure gekuppelt; Materialien, die dazu nicht ohne weiteres befähigt sind, wie z. B. die Kohlenwasserstoffe, werden zunächst vom Tier zu phenolartigen Verbindungen umgeformt und dann mit Schwefelsäure verknüpft. Außer dem in chemischer Hinsicht noch ungeklärten Auftreten von Antitoxinen stellt die Ätherschwefelsäure-bildung eines der wichtigsten chemischen Hilfsmittel dar, durch das der lebende Organismus schädliche Stoffe beseitigt; durch die Vereinigung mit Schwefelsäure verlieren nämlich die Phenole ihre Giftigkeit. Das Bestreben zur Erzeugung von Ätherschwefelsäuren ist so stark, daß Tiere, die anderweitig schwer vergiftet oder durch daseinsbedrohende Eingriffe

---

1) *E. Baumann*, Ber. **9**, 54, 1389, 1715, 1876; H. **2**, 335, 1878.
2) *E. Salkowski*, Ber. **9**, 1595, 1876; **10**, 842, 1877.

in wenigen Stunden dem Tode verfallen sind, sich eingeführter Phenole noch durch die Paarung mit Schwefelsäure zu entledigen suchen[1]).

Unserer heutigen Auffassung entspricht die Voraussetzung, daß so wichtige Naturprodukte wie die aromatischen Schwefelsäureester an geeigneten Stellen in der Natur auch wieder zerlegt werden. Nun sind die Ätherschwefelsäuren recht stabile Körper. Sie widerstehen der Einwirkung von Alkalien, sie werden selbst durch Fäulniserreger kaum angegriffen, sie sind in neutraler Lösung und sogar in Gegenwart organischer Säuren beständig. Trotzdem war anzunehmen, daß Fermente für die Zerlegung der Äthersulfate vorhanden sein müssen. Nach vielen vergeblichen Versuchen führte folgende Überlegung auf die richtige Spur. Mit dem Urin der Tiere gelangen in die Ackererde sehr beträchtliche Mengen der genannten organischen Schwefelsäureverbindungen, und dort wird ihr Schwefelsäurerest unzweifelhaft schließlich mineralisiert. In gewissem Sinne liegen die Verhältnisse ähnlich wie beim Harnstoff. Fermente, die dessen Hydrolyse zu Ammoniumcarbonat bewirken, kommen bei mannigfachen Kleinlebewesen vor und sind bekanntlich zuerst aus der Mikroorganismenflora des Harns selber isoliert worden. In Bakterien oder Pilzen vermuteten wir deshalb die Anwesenheit einer auf die Ätherschwefelsäuren abgestimmten *Sulfatase*, und tatsächlich fanden wir zunächst das gesuchte Enzym in einer Aspergillusart, dem Aspergillus oryzae.

Ein Extrakt dieses Erregers ist nun im Handel. Es ist dies die in großen Mengen in Japan fabrizierte *Takadiastase*, genannt nach ihrem Entdecker *Takamine*. In der Takadiastase sind mehrere, auch an anderen Stellen nachgewiesene Fermente vorhanden, deren bekanntestes eine hochwirksame Amylase ist.

Bringt man eine wässerige Lösung von phenolätherschwefelsaurem Kalium mit dem genannten Enzymmaterial in Gegenwart von Toluol als Antiseptikum zusammen, so erfolgt eine Spaltung in Phenol und schwefelsaures Salz. Dieselbe setzt schnell ein, und sie ist, wenn man den Versuch bei 37° vornimmt, in einer Stunde bereits deutlich. Säuert man nach dieser Zeit das leicht getrübte Gemisch von Substrat und Ferment mit Essigsäure an, so erfolgt die Klärung, indem das vorhandene Erdalkaliphosphat und eiweißähnliche Substanzen sich auflösen. Da phenolschwefelsaures Kalium bei Zimmertemperatur gegen verdünnte Essigsäure beständig ist, so beweist das Auftreten von Bariumsulfat bei Zusatz von Chlorbarium das Walten einer

[1]) Vgl. *J. Pohls* bekannte Versuche „Über Synthesenhemmung durch Diamine", Arch. f. exper. Pathol. u. Pharm. **41**, 97, 1898; s. a. *S. Lang*, H. **29**, 305, 1900; *F. Lade*, H. **79**, 327, 1912; etwas andere Anschauungen haben *G. Embden* u. *K. Glaessner* (Beitr. z. chem. Physiol. u. Patholog. **1**, 310, 1902) geäußert.

Sulfatase. Hatte die Mischung (s. S. 298) von phenolätherschwefelsaurem Salz und Ferment 24 Stunden im Wärmekasten gestanden, so waren 10 bis 11 Proz. des Ausgangsmaterials zerlegt. Dann schritt die Hydrolyse nur langsam fort, wie sich aus der nachstehend mitgeteilten Tabelle ergibt.

Nach 1 tägiger Digestion kann man auch den frei gewordenen aromatischen Paarling der Schwefelsäure leicht nachweisen. Destilliert man nunmehr einen Ansatz der genannten Art nach Zugabe von kohlensaurem Kalk, der jede sekundäre Veränderung verhindert, so wird Phenol übergetrieben; dasselbe kann mit Bromwasser oder mit Millons Reagens identifiziert werden. Auf abgespaltene Schwefelsäure kann man außer mit Bariumchlorid auch mit salzsaurem Benzidin prüfen. Unser Ferment enthielt selbst keine anorganischen Sulfate und lieferte auch beim Verweilen im Brutschranke keine Schwefelsäure, die ja von irgendwelchen organischen Bestandteilen hätte abgegeben werden können. Geht man von *reinem* phenolschwefelsauren Kalium aus, so erleidet dessen wässerige, mit Toluol versetzte Lösung selbst bei mehrwöchentlicher Aufbewahrung im Thermostaten keinerlei Zerfall.

Gemäß den angeführten Eigenschaften wird bei der Digestion einer Lösung von phenolschwefelsaurem Kalium *mit gekochtem Enzym* keine Schwefelsäure abgelöst. Damit ist zugleich die *Fermentnatur des Vorganges* sichergestellt; das neue Enzym wird zweckmäßig *Sulfatase* benannt. Ihre Wirkungen, Eigenschaften sowie Gewinnungsweise sollen eingehender studiert werden; ferner sind Versuche im Gange, Sulfatase an weiteren Stellen, insbesondere im Tierkörper und höheren Pflanzen, nachzuweisen und zu prüfen, ob auch andere Schwefelsäureester, z. B. die interessanten Scymnolschwefelsäuren von *O. Hammarsten*[1]) sowie die Äthersulfate der einfachen und aminierten Kohlenhydrate, fermentativ zerlegt werden können.

Die Bestimmung der abgespaltenen Schwefelsäure kann auf doppelte Weise geschehen. Sie kann einmal durch Fällung mit Bariumchlorid in kalter, klar filtrierter essigsaurer Lösung vorgenommen werden. Sie kann aber auch auf indirektem Wege erfolgen, indem man das Gemisch von Äthersulfat, seinen Zerfallsprodukten und Ferment nach der in der Harnanalyse üblichen Methodik[2]) behandelt. Hier schlägt man durch eine Lösung von Bariumchlorid in Barytwasser anorganisches Sulfat nebst Verunreinigungen nieder und ermittelt in einem klar filtierten Anteil die noch vorhandene Menge organischer Schwefelsäure durch Kochen mit Salzsäure, die in allen Fällen die phenolätherschwefelsauren Salze in der Hitze vollkommen hydrolysiert. Beide Verfahren sind anwendbar und liefern befriedigend übereinstimmende Ergebnisse.

---

[1]) *O. Hammarsten*, H. 24, 322, 1898.

[2]) Siehe *C. Neuberg*, Der Harn, S. 140, 1911, und *E. Salkowski*, Praktikum, 4. Aufl., 1912, S. 281.

Beispiele:

1. 1,0 g phenolschwefelsaures Kalium wurde in 100,0 ccm destillierten Wassers gelöst, mit 0,5 g Sulfatase sowie 1 ccm Toluol versetzt und bei 37° aufbewahrt. Nach 1 Stunde wurden 15,0 ccm durch ein trockenes Filter gegeben: 10,0 ccm klares Filtrat wurden mit Essigsäure angesäuert und mit Bariumchlorid gefällt. Nach dieser Zeit wurden bereits 0,0020 g $BaSO_4$ erhalten. Das entspricht einer Spaltung von 0,68 Proz. der Theorie.

Nach 22 Stunden lieferte die gleiche Probe 0,0115 g $BaSO_4$; Zerlegung = 3,9 Proz. Nach 48 Stunden wurden aus 10,0 ccm klaren Filtrats 0,0181 g $BaSO_4$ gewonnen, die eine Hydrolyse von 6,27 Proz. anzeigten.

2. 5 g phenolschwefelsaures Kalium in 500,0 ccm Wasser wurden mit 2 g Ferment und 5 ccm Toluol versetzt. Zur Bestimmung der hydrolytisch abgelösten Schwefelsäuremenge wurden 20,0 ccm der Lösung mit 20,0 ccm barytalkalischer Chlorbariumlösung vermischt und durch Zugabe von destilliertem Wasser auf ein Volumen von 50,0 ccm gebracht. Alsdann wurde durch ein trockenes Filter in ein trockenes Gefäß gegossen. 20,0 ccm des spiegelklaren Filtrats wurden mit Salzsäure angesäuert und 15 Minuten lang gekocht, wodurch alsbald die Schwefelsäure aus dem unzerlegten Rest des Äthersulfats in Freiheit gesetzt wurde.

Aus einem 8 Tage lang bei 37° digerierten Ansatz wurden auf diese Weise 0,0910 g Bariumsulfat erhalten; sie zeigen eine Spaltung von 14,49 Proz. an.

3. 5,0 g phenolschwefelsaures Kalium in 500 ccm Wasser, 2,0 g Ferment und 5 ccm Toluol; Temperatur 37°.

Nach	24	Stunden	waren	11,43	Proz.	der	Substanz	zerlegt,
„	3	Tagen	„	12,33	„	„	„	„ ,
„	6	„	„	12,81	„	„	„	„ ,
„	8	„	„	13,09	„	„	„	„ ,
„	10	„	„	13,37	„	„	„	„ ,
„	13	„	„	13,56	„	„	„	„ .
„	16	„	„	13,64	„	„	„	„ .

Anmerkung bei der Korrektur. Auch über andere, die Sulfatase begleitenden Enzyme, die vom Aspergillus oryzae hervorgebracht werden, wie über *Phosphatasen, Lecithinase und Glucuronase,* ist von *Neuberg* in der Sitzung der deutschen Chem. Gesellschaft vom 9. Juli 1923 berichtet worden.

Die Bilanz der Brenztraubensäuregärung.

Von

C. Neuberg und A. v. May.

(Aus dem Kaiser Wilhelm-Institut für experimentelle Therapie u. Biochemie in Berlin-Dahlem.)

Nach zahlreichen Erfahrungen, die in den vergangenen 12 Jahren gesammelt worden sind; hat die Brenztraubensäure eine nicht vorauszusehende Wichtigkeit für die Stoffwechsellehre erlangt. Sie nimmt nicht allein eine bedeutsame Stellung bei den Vorgängen des biochemischen Abbaues ein, sondern sie spielt auch eine erhebliche Rolle bei den Umsetzungen, die den Aufbau bewirken. Die außerordentliche Reaktionsfähigkeit der Brenztraubensäure, die sich in ihrem rein chemischen und physiologischen Verhalten offenbart, befähigt sie wie nur wenige andere Substanzen von biologischer Dignität zur Erfüllung der erwähnten Aufgaben. Ein Spaltungsprodukt der stickstofffreien und stickstoffhaltigen Materie, kann sie durch einfache und durchsichtige Umformungen wieder zu Synthesen der verschiedensten lebenswichtigen Verbindungen dienen. Sie gleicht dem dauerhaften und unentbehrlichen Mauersteine, der bei der Abtragung großer Bauwerke anfällt und als solcher oder in zugerichteter Gestalt zur Herstellung neuer Anlagen Verwendung findet; aber unter Putz und Anstrich vermag der Sachverständige auch im neuen Gefüge den behauenen und umgemodelten Mauerstein zu erkennen. Es sind die Beziehungen der Brenztraubensäure zum Eiweiß und seinen Spaltungsprodukten, ihre Zusammenhänge mit den Kohlenhydraten sowie die Verwandtschaft mit den Pflanzensäuren, die ihr diesen eigenartigen Platz zuweisen. Es ist die in mancher Hinsicht vorhandene Gleichwertigkeit mit den Zuckern, es ist ihre Stellung als Bindeglied zwischen den Körpern der Kohlenhydrat-, Fett- und Proteinreihe, die sie so beachtenswert machen.

Von den wichtigen Eigenschaften der Brenztraubensäure sind zwei durch ihr Verhalten zur Hefezelle aufgedeckt, ihre Vergärbarkeit und ihre Verwendbarkeit zum biologischen Aufbau längerer Kohlenstoffketten. Daher ist es eine Aufgabe von grundsätzlicher Bedeutung,

die Umwandlung der Brenztraubensäure durch den genannten Organismus bis in Einzelheiten und in quantitativer Hinsicht klarzustellen.

Auf die Brenztraubensäure als Zwischenstufe der Zuckerzerfallprodukte wirkt als spezifisches Enzym die Carboxylase, ein Partialferment des Zymasesystems. Den Wert der Brenztraubensäure als Wiederaufbaumaterial kennzeichnet das Kohlenstoffbrücken schlagende Ferment Carboligase. Beide Vorgänge, die sich an dem gleichen Substrat abspielen und im Fermentkreise eines und desselben Organismus liegen, können für eine gegebene Menge von Brenztraubensäure nicht unabhängig voneinander sein, sondern müssen sich berühren. In welchem Umfange sich beide Wirkungen überschneiden, darüber konnte nur eine quantitative Analyse der Brenztraubensäureumwandlung durch Hefe Aufschluß geben.

Nachdem *C. Neuberg* und *H. Wastenson*[1]) über die Gärfähigkeit der Brenztraubensäure berichtet hatten, konnten kurz darauf *C. Neuberg* und *L. Tir*[2]) den enzymatischen Charakter der Reaktion beweisen und alsbald *C. Neuberg* und *L. Karczag*[3]) die ersten Angaben über die quantitativen Verhältnisse mitteilen, die beim carboxylatischen Zerfall der Brenztraubensäure obwalten. Die Genannten haben damals die Spaltbarkeit der Brenztraubensäure im Sinne der Gleichung

$$CH_3 . CO . COOH = CO_2 + CH_3 . COH$$

erkannt; eine Umsetzung des Ausgangsmaterials wurde bis zu 50 Proz. erzielt. Später hat sich herausgestellt, daß die Zerlegung der freien Brenztraubensäure durch Hefen und Hefenfermente deshalb unvollständig bleiben kann, weil die Brenztraubensäure wegen ihres stark sauren Charakters (Dissoziationskonstante $K = 5{,}6 . 10^{-1}$) ein Gift für die Zelle wie für die von ihr abgetrennten Enzyme bedeutet. Zwar läßt sich die dadurch bedingte Störung durch Verwendung von brenztraubensauren Salzen oder das Milieu regelnden Moderatoren[4]) beheben oder einschränken. Dabei treten unter Umständen neue Komplikationen auf; in alkalischer Umgebung kann nämlich das typische Spaltungsprodukt der Brenztraubensäure, der Acetaldehyd, weiteren Umwandlungen unterliegen, indem sowohl eine Aldolisierung als eine Dismutation Platz zu greifen vermag[5]). Man muß auch damit rechnen, daß die höchst reaktionsfähige und daher überaus veränderliche Brenztraubensäure selbst bei irgendwelchen Zusätzen Kondensationen oder

---

[1]) *C. Neuberg* und *H. Wastenson*, Sitzungsber. d. physiol. Ges. 1910/11.
[2]) *C. Neuberg* und *L. Tir*, diese Zeitschr. **32**, 323, 1911.
[3]) *C. Neuberg* und *L. Karczag*, ebendaselbst **36**, 62, 68, 1911.
[4]) *C. Neuberg* und *P. Rosenthal*, ebendaselbst **51**, 132, 1913; *A. Harden*, Chem. Centralbl. **1913**, II, 1888; *C. Neuberg*, diese Zeitschr. **71**, 26, 1915.
[5]) *C. Neuberg* und *J. Hirsch*, diese Zeitschr. **96**, 192, 1919; **100**, 304, 1919.

Umformungen erleiden kann, die sie der carboxylatischen Vergärung entziehen. Somit konnte der Fehlbetrag, welcher für die Bilanz der Decarboxylierung von Brenztraubensäure bestand, auf Faktoren solcher Art bezogen werden, ohne in einen Widerspruch mit der aus anderen Beobachtungen zu ziehenden Schlußfolgerung zu geraten, daß die Brenztraubensäure ein natürliches Zwischenprodukt beim Zuckerzerfall ist und im Verlaufe desselben ohne jede Nebenreaktion die regelrechte Carboxylasespaltung erfährt; denn in der Norm werden jeweils winzige Mengen Brenztraubensäure gebildet und Molekül für Molekül der Umwandlung in solche Stoffe zugeführt, die selbst wieder Glieder in der Kette der geordneten Umsetzungen darstellen und als solche verschwinden, ohne in Gestalt unveränderlicher Enderzeugnisse zutage zu treten. Als aber das genaue Studium der *phytochemischen Reduktionen* die Erkenntnis brachte, daß nicht aller Acetaldehyd in freiem Zustande zu erscheinen braucht, wenn die Vergärung der Brenztraubensäure in Gegenwart eines anderen phytochemisch angreifbaren Aldehyds erfolgt, sondern daß die Elemente des Acetaldehyds mit dem beigegebenen fremden Körper eine Kohlenstoffkettensynthese eingehen[1]), mußten für eine bilanzmäßige Erfassung der Spaltungsprodukte von Brenztraubensäure diese Verhältnisse berücksichtigt werden. In dem Umfange, in dem der — sei es bei der Vergärung von Zucker, sei es bei der Vergärung von Brenztraubensäure — zu erwartende Acetaldehyd in die als Carboligasewirkung bezeichnete Kondensationsreaktion hineingerissen wird, vermindert sich die Ausbeute an freiem Acetaldehyd. Die Umsetzung, die sich bei der Vergärung von Brenztraubensäure beispielsweise in Gegenwart von Benzaldehyd im Sinne der Gleichung

$$CH_3 . CO . COOH + OHC . C_6H_5 = CO_2 + CH_3 . CO . CHOH . C_6H_5$$

vollzieht, zeigt, daß Acetaldehyd etwa im naszierenden Zustande von dem zugefügten Aldehyd mit Beschlag belegt werden kann. Daß in Abwesenheit eines fremden Aldehyds der Acetaldehyd selbst einen Akzeptor für das über die Brenztraubensäurestufe angelagerte Molekül Acetaldehyd abzugeben vermag, mit anderen Worten also, daß bei der Brenztraubensäurevergärung neben dem Acetaldehyd sein Acyloin, das Acetoin,

$$CH_3 . CO . COOH + OHC . CH_3 = CO_2 + CH_3 . CO . CHOH . CH_3$$

auftreten kann, hat *J. Hirsch*[2]) dargetan.

Für den Fall, daß weitere Umwandlungen der Brenztraubensäure nicht in Frage kommen, mußte man im Besitze der geschilderten Er-

[1]) *C. Neuberg* und *J. Hirsch*, diese Zeitschr. **115**, 282, 1921; *C. Neuberg* und *L. Liebermann*, ebendaselbst **121**, 311, 1921; *C. Neuberg* und *H. Ohle*, ebendaselbst **127**, 327, 1922; **128**, 610, 1922; *C. Neuberg*, Zeitschr. f. angew. Chemie **35**, 90, 1922.

[2]) *J. Hirsch*, ebendaselbst **131**, 178, 1922.

fahrungen imstande sein, mit Hilfe hinreichend genauer Methoden eine vollständige Bilanz der Brenztraubensäuregärung aufzustellen.

Einerlei, ob die Brenztraubensäure gemäß der Gleichung: $CH_3.CO.COOH = CO_2 + CH_3.COH$ in Kohlendioxyd und Acetaldehyd zerfällt, oder ob acyloinmäßig zwei Moleküle Acetaldehyd zum Acetyl-methyl-carbinol (Acetoin) zusammengeschlossen werden:

$$2\,CH_3.CO.COOH = 2\,CO_2 + CH_3.CO.CHOH.CH_3,$$

stets muß auf ein Molekül zerlegter Brenztraubensäure ein Molekül Kohlendioxyd in Freiheit gesetzt werden. Die analytischen Maßnahmen bestanden daher in der Ermittlung des CO_2-Gases und in einer genauen Bestimmung von Acetaldehyd und Acetoin nebeneinander. Nach mannigfachen Schwierigkeiten gelang eine befriedigende Lösung dieser Aufgabe nach folgenden Verfahren.

Destilliert man in üblicher Weise den Acetaldehyd aus einem ausgegorenen Brenztraubensäureansatz über, indem man durch vorherige Behandlung mit $CaCO_3$ unangegriffene Brenztraubensäure als Calciumsalz zurückhält, so begleitet den freien Acetaldehyd auch etwas Acetoin. Bei der Bestimmung des Acetaldehyds nach der *Ripper-Fürth*schen Methode — Bindung an saures schwefligsaures Salz und jodometrische Zurücktitrierung des nicht verbrauchten Sulfits — wird auch beigemengtes flüchtiges Acetoin als scheinbarer Acetaldehyd ermittelt. Stellt man dann aber gravimetrisch den Acetaldehydgehalt mit Hilfe von Dimedon (Dimethylhydroresorcin) fest, so erhält man die richtigen Werte für den Acetaldehyd, da der Ketonalkohol mit dem Dimedon keine unlösliche Verbindung liefert bzw. gar nicht reagiert. Der beim Übertreiben des Acetaldehyds mitgerissene Teil des Acetoins kann also gefunden werden, wenn man den aus der Aldomedonbestimmung sich ergebenden Aldehydertrag abzieht, bzw. der wahre Gehalt an Acetaldehyd, indem man das Acetoin im Destillat zur Abscheidung bringt (s. unten) und das gefundene Acetoin vom titrimetrisch ermittelten „Aldehydgehalt“ subtrahiert. Die Gesamtmenge des gebildeten Acetoins kann man im Gärgut durch Abscheidung als p-Nitrophenyl-osazon feststellen; denn weder Brenztraubensäure noch Acetaldehyd liefern mit p-Nitrophenyl-hydrazin eine Verbindung, die in heißem Alkohol unlöslich ist, wie das charakteristische scharlachrote p-Nitro-osazon des Acetyl-methyl-carbinols. Dieses kann somit ohne weiteres von den begleitenden Stoffen getrennt und nach Kontrolle durch den ungewöhnlich hoch liegenden Schmelzpunkt (316°) gewogen werden. Man kann natürlich das ins Destillat (s. oben) etwa übergegangene Acetoin gleichfalls nach der p-Nitrophenyl-osazon-Methode isolieren. Freilich gelingt es auch mit reinem, synthetisch dargestelltem Acetyl-methyl-carbinol nicht, eine quantitative Ausbeute an der

p-Nitrophenyl-hydrazinverbindung zu erreichen; man mußte also in Lösungen von reinem Acetyl-methyl-carbinol den erzielbaren Ertrag an Osazon ausfindig machen und dadurch die Grundlage für die erforderliche Anbringung der Korrektur schaffen, die dann den Rückschluß auf die wirklich vorhandene Menge Acetoin ermöglicht. Bestimmt man dann noch die in Freiheit gesetzte Kohlensäure und ermittelt, wieviel von der angewendeten Brenztraubensäure unzerlegt geblieben ist, so hat man alle Ausweise für eine *Bilanz der Vergärung von Brenztraubensäure mittels lebender Hefe.*

Ein unangegriffener Anteil der Brenztraubensäure selbst konnte mit Phenylhydrazin nach dem Vorgange von *de Jong*[1]) festgestellt werden. Acetaldehyd und Acetoin fallen bei richtiger Ausführung der Analyse unter den obwaltenden Konzentrationsverhältnissen nicht in fester Form aus, wie an Hand eingehender Versuche ermittelt wurde; sie stören jedoch die quantitative Abscheidung des Brenztraubensäure-phenylhydrazons, indem das ölige Phenylhydrazinderivat des Acetaldehyds die Verbindung der Brenztraubensäure mit Phenylhydrazin teilweise in Lösung hält; ein Zusatz von Kochsalz und Aufbewahren im Eisschrank über Nacht verringert diesen Übelstand.

Man kann aber die restierende Brenztraubensäure genügend genau titrimetrisch ermitteln, da eine irgendwie in Betracht kommende Säuerung des Gärgutes durch Bestandteile oder Zerfallsprodukte der frischen Hefe nicht stattfindet.

Die *bilanzmäßige Untersuchung der Brenztraubensäuregärung* wurde *auch an zellfreien Ansätzen* vorgenommen; dabei sind einige Abänderungen der Analysenmethoden erforderlich gewesen. Da zur Wahrung der Sterilität Toluol zugegeben wurde und dieses sich bei dem Abdestillieren dem freien Aldehyd beimengte, so war die Ausführung des Dimedonverfahrens erschwert; das Toluol beeinträchtigte nämlich die gute und quantitative Abscheidung des Acetaldomedons. Zu brauchbaren Resultaten gelangt man in den Ansätzen mit Hefensäften dadurch, daß man Acetaldehyd nebst übergegangenem Acetoin nach der *Ripper*schen Methode ermittelte, das dabei mitbestimmte Acetoin als p-Nitrophenyl-osazon abschied und dann in Abzug brachte. Des weiteren ist in zellfreien Ansätzen, wo eine erhebliche Bildung von Säuren aus dem Hefematerial vor sich geht, weder die titrimetrische Analyse der unveränderten Brenztraubensäure, noch ihre Fällung als Hydrazon durchführbar; diese wird durch die in Lösung reichlich übertretenden stickstoffhaltigen Stoffe erschwert[2]). Man begnügt sich daher mit der Feststellung der entwickelten Menge Kohlendioxyd

[1]) *A. W. K. de Jong*, Rec. 19, 280, 1900.
[2]) *C. Neuberg*, H. 29, 274, 1900.

als Maß für die stattgehabte Spaltung der Brenztraubensäure. Die Erfassung des Acetoins als p-Nitrophenyl-osazon muß dergestalt erfolgen, daß man durch Erwärmen am Rückflußkühler zunächst koagulables Eiweiß beseitigt, dann durch Zugabe von absolutem Alkohol die Hauptmenge störender Stickstoffverbindungen niederschlägt, im Filtrat das außerordentlich leicht in Sprit lösliche Acetoin mit p-Nitrophenyl-hydrazin vereinigt und nunmehr durch Abdestillieren des Weingeistes in fester Form zur Abscheidung bringt. Dieses Verfahren bewährt sich übrigens ganz allgemein zum Nachweise und zur Bestimmung des Acetoins in Gemischen, die Eiweiß oder seine Spaltungsprodukte enthalten. Die Isolierung des Acetoins wurde auch nach dem Vorgange von *M. Lemoigne*[1]) erreicht; im vorliegenden Falle ist sie aber umständlicher als die zuvor beschriebene, da die Anwesenheit von Abbauprodukten der Hefenproteine lästiges Schäumen mit sich bringt.

Um die Versuchsanordnung nicht verwickelter zu gestalten, namentlich um die Titration der restierenden Brenztraubensäure ausführen zu können, sind die mit frischen Hefen angestellten Versuche bei der sauren Reaktion vorgenommen, wie sie einer etwa n/10 Brenztraubensäurelösung eigen ist. Bei den zellfreien Gärungen wurde angesichts der Empfindlichkeit der Hefensäfte, nach den Erfahrungen von *C. Neuberg* und *P. Rosenthal* (l. c.) über die günstige Wirkung der Pufferung, ein Gemisch von m-Brenztraubensäure und m-K_2HPO_4 im Verhältnis von 2 : 3 angewendet; ein solches Gemenge zeigte nach der Zugabe von Mazerationssaft anfangs die Wasserstoffionenkonzentration $p_H = 5{,}32$ bis 5,50, während am Ende der Gärung infolge der CO_2-Abspaltung $p_H = 5{,}82$ bis 6,20 betrug.

Wie vorher schon angegeben wurde, ist es für die bedeutsame Rolle, welche die Brenztraubensäure im Haushalte der Natur spielt, von Belang, daß ihre Vergärung nicht allein in saurem Medium, sondern auch bei neutraler und selbst alkalischer Reaktion vonstatten geht. Aber nicht nur eine Besetzung des typischen Wasserstoffatoms im Carboxylrest der Brenztraubensäure vermag ihre Gärfähigkeit nicht aufzuheben, sondern auch Verbindungen, die durch eine Beteiligung der Carbonylgruppe entstehen, sind grundsätzlich der carboxylatischen Spaltung zugänglich. Dieses Verhalten ist beispielsweise für die Brenztraubensäure-Sulfit-Komplexe festgestellt worden[2]); es ist von Wichtigkeit für die Erklärung der Vorgänge bei der zweiten Vergärungsform, die in der Acetaldehyd-Glycerin-Spaltung unter dem Einfluß intermediär angelagerten schwefligsauren Salzes besteht. Wie *C. Neuberg* und

---

[1]) *M. Lemoigne*, Ann. de l'Institut Pasteur **27**, 856, 1913.

[2]) *C. Neuberg* und *E. Reinfurth*, diese Zeitschr. **89**, 413, 1918; Ber. **53**, 462, 1039, 1920.

E. Reinfurth gezeigt haben, vergären z. B. molekulare Gemische von Brenztraubensäure und sekundärem Sulfit bei Herstellung einer geeigneten Wasserstoffionenkonzentration glatt zu Kohlendioxyd und Acetaldehyd, der dabei natürlich als Aldehyd-Sulfit-Aggregat auftritt. *Neuberg* und *Reinfurth* (l. c.) gelang die Zerlegung der Brenztraubensäure in Gegenwart von Sulfiten in einem Ausmaße von praktisch 100 Proz. Die gewonnenen Daten bezogen sich auf Messung der freigewordenen Kohlensäure; zum Teil etwas geringer war die analytisch festgestellte Menge Acetaldehyd. Es war also mit dem Falle zu rechnen, daß bei dem theoretisch so beachtenswerten Vorgange der Vergärung von Brenztraubensäure-Sulfitkomplexen die kleine Unstimmigkeit zwischen aufgefangener Menge CO_2 und gewonnenem Acetaldehyd darauf zurückzuführen sei, daß neben dem Acetaldehyd auch Acetoin anwesend ist. Es lag aber auch im Bereiche der Möglichkeiten, daß gerade die Bindung der Brenztraubensäure an schwefligsaures Salz lediglich eine Loslösung von CO_2 unter dem Einflusse der Carboxylase zuläßt, so daß als einziges nicht gasförmiges Erzeugnis der Vergärung Acetaldehyd-Sulfit — ohne Beimengung von Acetoin — entsteht, mit anderen Worten, daß bei Zugabe von schwefligsaurem Salz eine klare Trennung von Carboxylase- und Carboligasewirkung zustande kommt. *Die Versuche haben gelehrt, daß die Anwesenheit der schwefligsauren Salze eine Verschiebung derart bedingte, daß ganz überwiegend die reine Carboxylasespaltung erfolgte und nur Spuren Acetoins sich einstellten.* Daß von diesem eine geringfügige Menge überhaupt vorhanden war, dürfte darin seine Erklärung finden, daß weder die Schwefligsäureverbindung der Brenztraubensäure noch der Aldehyd-Sulfitkomplex uneingeschränkt beständig sind, sondern einer teilweisen Dissoziation unterliegen, als deren Folge ein wenig Brenztraubensäure bzw. Acetaldehyd frei zugegen ist und sich carboligatisch umsetzen kann.

Diese Ergebnisse wurden durch die Untersuchungen mit verschiedenen Sorten Trockenhefe sichergestellt; in allen Fällen belief sich der Ertrag an gerade nachweisbarem Acetoin höchstens auf 2 Proz. des isolierten Acetaldehyds.

Von der Wiedergabe der eingehenden Vorarbeiten zur Ausprobierung der Methoden und besten Bedingungen nehmen wir Abstand und beschreiben allein einige gut gelungene und ohne Zwischenfälle durchgeführte Versuche größeren Umfangs.

I. Die Verhältnisse bei der Vergärung von Brenztrauben- mit frischen Hefen.

A. 13,2 g Brenztraubensäure, die unmittelbar vor dem Versuche durch Vakuumdestillation in völliger Reinheit gewonnen war, wurden in Wasser zum Volumen von 1500 ccm gelöst und auf 0° abgekühlt.

Bei dieser Temperatur wurden 100 g im Eisschrank aufbewahrt gewesener untergäriger Hefe (Patzenhofer) eingetragen, die zuvor sorgfältig gewaschen und scharf abgepreßt worden war. Nachdem wir die Hefe durch Schütteln vollkommen gleichmäßig verteilt hatten, wurden 10,0 ccm der Mischung abpipettiert und in einen Gasmeßapparat mit Quecksilberabschluß gebracht. Der Rest befand sich in einer 2-Liter-Flasche; dieselbe wurde in den Brutschrank gestellt und sofort mit zwei außerhalb des Thermostaten befindlichen Vorlagen verbunden, welche mit gesättigter Dimedonlösung beschickt waren. Die Temperatur des Wärmekastens, in dem auch der erwähnte kleine Gasmeßapparat stand, betrug 37°. In letzterem waren nach 16 Stunden 18,2 ccm Kohlendioxyd entwickelt, ein Wert, der auch nach 24 Stunden sich nicht mehr änderte. Die Ablesung geschah bei 18° und 743 mm Druck; sie zeigte 0,0321 g CO_2 an, oder daß 74,3 Proz. der Brenztraubensäure umgesetzt waren. Für das gesamte Gärgut ergibt sich eine Entwicklung von 4,82 g CO_2, entsprechend 9,64 g decarboxylierter Brenztraubensäure. Nach 36 Stunden erfolgte die Aufarbeitung. Sie erstreckte sich auf *die Bestimmungen a) des entstandenen Acetaldehyds, b) des carboligatisch gebildeten Acetoins, c) der übrig gebliebenen unvergorenen Brenztraubensäure.*

Zu a) 100,0 ccm des Gärgutes wurden nach dem Verfahren von *Neuberg* und *Reinfurth* mit überschüssigem kohlensauren Kalk versetzt, damit einige Zeit stehen gelassen und darauf destilliert. In den übergegangenen 470 ccm wurden 0,240 g „Acetaldehyd" gefunden. Im Gesamtgärgut wären also 3,60 g Acetaldehyd vorhanden.

Zur Entscheidung der Frage, wieviel von diesem durch die Titration mit Bisulfit ermittelten Carbonylkörper tatsächlich aus Acetaldehyd bestand und wieviel Acetoin letzterem beigemengt war, wurden 200 ccm des erwähnten Destillates (Gesamtmenge 470 ccm) mit einer Lösung von 1 g Dimedon in 250 ccm zusammengebracht. Nach mehrstündigem Stehen wurde das ausgeschiedene Aldomedon abgesaugt, gewaschen und getrocknet. Zur Wägung gelangten 0,5254 g Aldomedon, welches bei 137 bis 139° schmolz und das bei 174° sich verflüssigende Anhydrid lieferte. Die Menge entsprach — unter Berücksichtigung der Löslichkeit von Acetaldomedon in Wasser — 0,0809 g Acetaldehyd in 200 ccm Destillat oder 2,85 g Acetaldehyd im Gesamtgärgute.

In der ersten der beiden mit Dimedon gefüllten Vorlagen waren 0,0804 g Acetaldomedon, gleich 0,012 g Acetaldehyd, niedergeschlagen. In die zweite Vorlage war kein Acetaldehyd mehr übergetreten, so wenig wie in ein drittes Gefäß, eine mit reinstem Alkohol beschickte Gaswaschflasche. Mit dem Inhalt der Vorlagen 2 und 3 konnten keine positiven Reaktionen auf Acetaldehyd erhalten werden.

Der tatsächliche Ertrag an *Acetaldehyd* beziffert sich also auf 2,862 g.

Zu b). Wie angegeben wurde, kann man die quantitative Bestimmung des Acetoins auf die Abscheidung als p-Nitrophenyl-osazon gründen. Um beurteilen zu können, wieviel p-Nitrophenyl-osazon überhaupt aus ver-

schieden konzentrierten Lösungen von Acetoin zu gewinnen ist, haben wir Versuche mit reinem Acetoin (Dimethylketol) vorgenommen, das nach den Angaben von *O. Diels* und *E. Stephan*[1]) bereitet worden war. Das p-Nitrophenyl-osazon wurde aus Lösungen dargestellt, die das Acetoin in $^1/_{100}$, $^1/_{1000}$ und $^1/_{5000}$ Verdünnung enthielten.

Wegen der sehr beträchtlichen Schwerlöslickeit des p-Nitrophenyl-osazons schwankten die Mengen verhältnismäßig unbedeutend; es gelang, 65,5 bis 67,5 Proz., im Durchschnitt also 66,5 Proz. der in Lösung befindlichen Acetoinmenge in Form des hoch schmelzenden und leicht rein erhältlichen p-Nitrophenyl-osazons abzuscheiden. Dasselbe ist sehr schwer löslich in Wasser, verdünnter Essigsäure, Alkohol und Äther, so daß es nacheinander mit diesen Solvenzien behandelt und dadurch von anhaftenden Beimengen befreit werden kann.

Auf Grund dieser Feststellungen gelangt man zu einem Faktor, mit dem man aus dem p-Nitrophenyl-osazon das Quantum des zugrundeliegenden Acetoins ohne weiteres ableiten kann. Als Verhältnisgleichung ergibt sich:

$$\text{g vorhandenes Acetoin} = \frac{\text{gewogenes Osazon} \times 88 \times 100}{356 \times 66{,}5}$$

$$= \text{gewogenes Osazon} \times 0{,}371.$$

Auf diese Weise wurden in 500,0 ccm filtrierten Gärgutes 1,8596 g an p-Nitrophenyl-osazon abgeschieden = 0,6899 g an wirklich vorhandenem Acetoin.

Diese Zahl entspricht einer Gesamtausbeute von 2,07 g *Acetoin.*

Bei der Bestimmung des Acetaldehyds nach dem Destillations-Titrationsverfahren von *Neuberg* und *Reinfurth* verflüchtigt sich neben dem Acetaldehyd, wie angeführt ist, auch ein Teil des Acetoins; deshalb wurde die Bestimmung des Gesamtacetoins nach vorstehend beschriebener Art im Gärgut selbst vorgenommen.

Man gewinnt an Hand der mitgeteilten Analysendaten *folgendes Bild von den quantitativen Verhältnissen der Brenztraubensäuregärung*:

Entwickelte Kohlensäure	4,82 g
Acetaldehyd (als Dimedonverbindung)	2,86 g
Acetoin (als p-Nitrophenyl-osazon)	2,07 g
	9,75 g.

Vergleichsweise führen wir auch die Zahlen an, bei denen der Ausbeutenfaktor für Acetoin unberücksichtigt blieb; hier ist also die infolge des Acetoingehaltes zu hohe titrimetrisch gefundene Aldehydzahl und die mit rund einem Drittel gegen die Theorie zu niedrige tatsächliche Ausbeute an Acetoin-p-nitrophenylosazon aufgenommen. Diese Werte lauten:

Entwickelte Menge Kohlensäure	4,82 g
Durch Titration gefundene Aldehydmenge . . .	3,60 g
Acetoin (aus direkt abgeschiedenem p-Nitrophenyl-osazon)	1,38 g
	9,80 g.

[1]) *O. Diels* und *E. Stephan*, B. **40**, 4336, 1907.

Nun ist das Molekulargewicht von Brenztraubensäure 88, das von Kohlensäure und Acetaldehyd 44 und das von m/2 Acetoin gleichfalls 44. Somit muß das Gewicht der außer Kohlensäure entstandenen Produkte gleich dem Gewichte von CO_2 selber sein. Wie man sieht, ist dies nach unseren Feststellungen recht genau der Fall.

Vergeblich ist auf Butylenglykol gefahndet, das durch weitere Umwandlung, durch Reduktion, aus dem Acetoin hervorgehen könnte; es war unter den obwaltenden Versuchsbedingungen nicht in nachweisbarer Menge vorhanden.

Es zeigt sich also zunächst, daß die Zerfallsprodukte der Brenztraubensäure im Verhältnis von 1 Mol. CO_2 zu 1 Mol. Acetaldehyd (frei + Acyloinkondensat) stehen.

Zu c). Des weiteren wurde die Menge unangegriffener Brenztraubensäure ermittelt. Anfangs wurde die Abscheidung als Phenyl-hydrazon nach der Vorschrift von *de Jong* vorgenommen; sie blieb aber aus den zuvor (S. 303) dargelegten Gründen unvollständig. So konnte aus 275 ccm klar filtrierten Gärgutes, wie es zu den Analysen nach a) und b) verwendet worden war, im günstigsten Falle nach Zugabe von Kochsalz und Stehenlassen im Eisschrank 0,746 g Brenztraubensäure-phenyl-hydrazon isoliert werden. Das entspricht 0,369 g Brenztraubensäure oder 2,012 g unvergorener Säure im Gesamtgärgut. Die Titration mit n/10 NaOH (bei Phenolphthalein als Indikator) zeigte jedoch die Anwesenheit von 3,36 g nicht carboxylatisch gespaltener Säure an. In einer Aufschwemmung unserer Hefe in Wasser traten unter den Bedingungen des Brenztraubensäuregärungsversuches bei gleichzeitiger Digestion im Thermostaten nicht mehr als Spuren von Säure auf. Demnach kann der aus der Titration sich ergebende Wert von 3,36 g unveränderter Brenztraubensäure als zuverlässig gelten.

Aus den vorhin mitgeteilten Daten über die gasometrische Messung ergibt sich ein Verbrauch von 9,64 g Brenztraubensäure, und fast genau die gleiche Zahl erhält man als Summe aller Gärungsprodukte. Somit steht der Titrationswert, der direkt 3,36 g unzerlegte Brenztraubensäure anzeigt, in guter Übereinstimmung mit der Differenzzahl, die 13,2 — 9,75 = 3,45 g lautet.

Daß die als *p-Nitrophenyl-osazon* abgeschiedene Verbindung tatsächlich das Derivat *des Acetoins* ist, folgt aus den Elementaranalysen. Für diese ist in allen Fällen das Material aus Pyridin-Eisessig umkristallisiert worden[1]), aus dem es sich in prachtvollen dunkelroten Nadeln vom Schmelzpunkt 316° abschied.

0,1622 g Substanz: 0,3207 g CO_2 und 0,0728 g H_2O.
0,1756 g Substanz: 35,5 ccm N (20°, 765 mm).
$C_{16}H_{16}N_6O_4$. Ber.: C = 53,93 Proz., H = 4,49 Proz., N = 23,60 Proz.;
gef.: C = 54,00 Proz., H = 4,99 Proz., N = 23,31 Proz.

[1]) Vgl. *C. Neuberg*, B. 32, 3384, 1899.

II. Die Verhältnisse bei der zellfreien Vergärung von Brenztraubensäure.

Um das Ineinandergreifen von carboxylatischer und carboligatischer Wirkung auch bei der Vergärung von Brenztraubensäure ohne lebende Zellen in quantitativer Hinsicht zu verfolgen, wurden mehrere Versuche nachstehender Art ausgeführt.

Aus 3,5 kg untergäriger Trockenhefe wurden mit 12 Litern Wasser durch 2½stündige Mazeration in bekannter Weise ein Saft bereitet. Derselbe wies keine Selbstgärung auf. Gleichzeitig wurde ein Gemisch von 400,0 ccm molekularer Brenztraubensäure (enthaltend 35,2 g in vacuo frisch rektifizierten Materials) mit 600 ccm molekularer Dikaliumphosphatlösung hergestellt. Das stark abgekühlte Gemenge wurde zu 3,4 Liter Mazerationssaft gegeben. Dabei darf, wenigstens zunächst, weder Trübung noch Fällung auftreten. Dieses Gärgemisch hatte eine für die Brenztraubensäuregärung günstige Wasserstoffionenkonzentration. Die Gaskettenmessung[1]) lieferte für das erwähnte Gemenge von Brenztraubensäure, K_2HPO_4 und Mazerationssaft zu Anfang den Wert $p_H = 5{,}32$ bis 5,50, der am Ende der Gärung 5,82 bis 6,20 betrug[2]). Nach Zugabe von 44 ccm Toluol kam der Ansatz in den Brutschrank, wobei im übrigen die zuvor beschriebene Versuchsordnung innegehalten wurde.

10,0 ccm des Gemenges waren vor Unterbringung im Wärmekasten in ein Gasmeßgefäß übergeführt worden; dasselbe wurde dann in denselben Brutschrank gestellt. In 16 Stunden waren 11,6 ccm CO_2 und nach 24 Stunden 12,2 ccm CO_2 in dem abgezweigten Anteil entwickelt. Diese Menge änderte sich nach Ablauf von 24 Stunden nicht mehr. Die 12,2 ccm CO_2 wiegen 0,024 g CO_2. Da in den abgenommenen 10,0 ccm des Gärgemisches 0,08 g Brenztraubensäure enthalten waren, sind somit 60 Proz. Brenztraubensäure vergoren gewesen.

Hierauf wurden zu der Hauptmenge des Gäransatzes noch 800 ccm aus derselben Trockenhefe bereiteter Mazerationssaft gefügt, so daß nun 4200 ccm Saft im ganzen zur Anwendung gelangt waren. In den Gasmeßapparat wurden dementsprechend 2,0 ccm frischer Saft nachgefüllt. Darauf wurden innerhalb 12 Stunden noch 8,5 ccm Kohlendioxyd entwickelt, so daß nach einem weiteren Tage in toto 20,7 ccm CO_2 vorhanden waren. Diese Menge entspricht bei einem Barometerstande von 746 mm und bei 18° 0,037 g CO_2. Für das Gesamtgärgut folgt daraus eine Kohlensäureabgabe von 16,03 g oder eine Vergärung der vorhandenen Brenztraubensäure zu 91,08 Proz. Da nach achtstündigem Zuwarten keine Zunahme an Kohlendioxyd zu bemerken gewesen war, so wurde der Versuch abgebrochen.

---

[1]) Herrn Prof. *Freundlich* und Herrn Dr. *Stern* vom Kaiser Wilhelm-Institut für physikalische Chemie und Elektrochemie sei für die in zuvorkommender Weise gestattete Benutzung ihrer Apparatur für die p_H-Messungen bestens gedankt.

[2]) Vgl. hierzu einen nach der Indikatorenmethode von *E. Abderhalden* und *A. Fodor* (Fermentforschung **5**, 163, 1921) erhaltenen Wert.

Die Bestimmung des Acetaldehyds geschah wieder nach dem Destillationsverfahren von *C. Neuberg* und *E. Reinfurth*. Eine Modifikation wurde insofern angebracht, als die Destillation des Gärgutes aus einem Kupferkolben geschah. Heizte man diesen in einem Kochsalzbade an, so erfolgte eine Koagulation des aus dem Hefesaft stammenden Eiweißes in so groben Flocken, daß beim späteren Abtreiben des Acetaldehyds mit Wasserdampf kein unbequemes Schäumen eintrat. Da zweckmäßig eine direkte Erwärmung des Destillationsgefäßes unterblieb, um ein Anbrennen der Proteingerinnsel zu verhindern, so mußte die Wasserdampfdestillation etwas länger fortgesetzt werden. Das erste verdünnte Destillat wurde deshalb durch eine anreichernde erneute Destillation konzentriert. In 730 ccm Destillat, entsprechend 500,0 ccm Urlösung, wurden 1,2976 g und im Gesamtgärgute demzufolge 13,495 g „Acetaldehyd" gefunden.

Die richtige Bedeutung der durch Titration festgestellten Zahlen sowie die durch carboligatische Tätigkeit entstandene Acetoinmenge wurde auf folgende Weise ermittelt. 500,0 ccm desselben Destillates wurden mit p-Nitrophenyl-hydrazin-acetat behandelt, d. h. erst einige Zeit in der Kälte damit stehen gelassen und dann am Rückflußkühler im Wasserbade gekocht. Erhalten wurden 0,507 g Acetoin-p-nitrophenyl-osazon vom Schmelzpunkt 312°. Dieses Quantum macht (vgl. vorher S. 307) 0,275 g Acetoin im Gesamtdestillat oder 2,860 g für das Gesamtgärgut aus. Zu vorgelegten Waschflaschen, die Dimedonlösung enthielten, waren 0,216 g Aldomedon, gleich 0,031 g Acetaldehyd, ausgefallen; diese Quantität ist hinzuzurechnen.

Die Menge tatsächlich vorhandenen *Acetaldehyds* stellt sich somit auf 13,495 − 2,860 + 0,031 = 10,666 g.

Zur Ermittlung des in toto gebildeten *Acetoins* wurde das gesamte noch zur Verfügung stehende Gärgut in einem großen Glaskolben im Wasserbade erwärmt, wobei durch Anwendung eines Rückflußkühlers Verlusten an Acetoin vorgebeugt wurde. Von dem reichlichen Eiweißkoagulum wurden 700 ccm abfiltriert und durch Zugabe von 4 Litern absoluten Alkohols von stickstoffhaltigen Materialien befreit. Nach Filtration und Auswaschung mit Weingeist wurde durch 3½stündiges Kochen mit einem Überschuß an p-Nitrophenyl-hydrazin-acetat und Abdestillieren des Alkohols ein prachtvoll dunkelviolett schimmernder Niederschlag von Acetoin-p-nitrophenyl-osazon gewonnen, das bei 314 bis 316° schmolz und sich nach der weiter unten mitgeteilten Analyse als rein erwies. In dünner Schicht zeigten die schön ausgebildeten Nadeln unter dem Mikroskop die Eigenschaft der Phototropie, da sie sich im Lichte in kurzer Zeit hellrot färbten.

Gewogen wurden 1,6238 g Osazon, woraus sich für das Gesamtgärgut ein Gehalt von 4,47 g *Acetoin* ergab.

Eine *zweite Methode zur Isolierung des Acetoins* besteht darin, daß man nach Entfernung des gerinnbaren Eiweißes das Acetoin nach der Angabe von *Lemoigne* (l. c.) durch Vakuumdestillation übertreibt. Das sehr lästige Schäumen kann durch Zugabe einiger Tropfen Octylalkohol gemildert werden. Aus dem Destillate kann man dann das Acetoin gleichfalls als p-Nitrophenyl-osazon isolieren, wenn man den durch Acetyl-p-nitrophenylhydrazin verunreinigten Niederschlag mit heißem Alkohol auszieht. Bei Verarbeitung von 700,0 ccm Gärgut wurden so 1,752 g reines Acetoin-p-nitrophenyl-osazon vom Schmelzpunkt 314° gewonnen; demnach waren im Gesamtgärgut 4,83 g Acetoin anwesend.

Wie man sieht, stehen diese Mengen in guter Übereinstimmung mit den Ausbeuten, die wir für das durch einfache Alkoholfällung gereinigte Gärgut erzielt hatten.

Die *Bilanz der zellfreien Brenztraubensäuregärung* stellt sich also nach Einsetzung des Durchschnittswertes für das nach beiden Methoden gefundene Acetoin folgendermaßen.

Gebildete Menge Acetaldehyd	10,67 g
Acetoin.	4,65 g
	15,32 g
Kohlendioxyd	16,03 g

Wie bei der Vergärung mit lebender Hefe, stimmt auch hier das Gewicht des entwickelten CO_2 mit der Summe der Gewichte der übrigen Gärprodukte ungefähr überein. Somit kann ein Zerfall von Brenztraubensäure lediglich zu Kohlensäure, Acetaldehyd und Acetoin auch für die zellenfreie Gärung angenommen werden. Der Gasmeßversuch (s. vorher S. 309) hatte einen Vergärungsgrad der Brenztraubensäure von 91,08 Proz. angezeigt, und innerhalb der Fehlergrenzen entsprach die Gesamtmenge der übrigen Gärprodukte angenähert dem gleichen Betrage.

Das Vorliegen von Acetoin-p-nitrophenyl-osazon wurde hier ebenfalls durch die Analyse sichergestellt.

0,1708 g Substanz: 0,3405 g CO_2 und 0,0767 g H_2O.
0,1882 g Substanz: 38,0 ccm N (765 mm, 18,5°).
$C_{16}H_{16}N_6O_4$: Ber. C = 53,93 Proz., H = 4,49 Proz., N = 23,60 Proz.;
gef. C = 54,37 Proz., H = 4,98 Proz., N = 23,45 Proz.

III. Die Verhältnisse bei der Vergärung von Pyruvinatsulfit.

Für die Theorie der Gärung ganz allgemein und für die Erkenntnis der Carboxylasewirkung im besonderen ist die von *C. Neuberg* und *E. Reinfurth* festgestellte Tatsache wichtig, daß auch Brenztraubensäure-*Verbindungen* vergärbar sind, wie z. B. Derivate, die unter Beteiligung der Carbonylgruppe der Brenztraubensäure entstanden sind. Außer dem Aldol der Brenztraubensäure gehört zu diesen gärungsfähigen Substanzen der Pyruvinatreihe der Aldehyd-Sulfitkomplex, dem folgende Formel zuzuerkennen ist: $CH_3 . C(OH)(O . SO_2H) . COOH$. Schweflige Säure kann sich namentlich in Form des Natriumbisulfits allgemein an Carbonylgruppen anlagern; es ließ sich daher nicht voraussehen, ob die Vergärung von Pyruvinatsulfit nur die Schwefligsäureverbindung des Acetaldehyds oder auch die des Acetoins bzw. die beider Substanzen liefern würde.

Zur Entscheidung nicht allein dieser Frage, sondern auch zur Erlangung einer *Bilanz für die Brenztraubensäuregärung in Gegenwart von Sulfiten* wurden Versuche nachstehender Art vorgenommen; sie

hatten stets ein gleichsinniges Ergebnis, so daß die Wiedergabe einiger Beispiele genügen mag.

a) 20,0 ccm m-Brenztraubensäure, 20,0 ccm m-Dinatriumsulfit und 20,0 ccm Essigsäure-Natriumacetatpuffer[1]) wurden mit 140 ccm Wasser sowie 1,5 ccm Toluol versetzt. Nach Einrühren von 30 g untergäriger Trockenhefe (Hefe der Schultheissbrauerei in Berlin) blieb das Gemisch 5 Tage bei Zimmertemperatur stehen. Die Aufarbeitung geschah darauf nach den Angaben von *C. Neuberg* und *E. Reinfurth*, indem das Gärgemisch mit 10,0 ccm m-Sodalösung versetzt, mit 20,0 ccm m-$BaCl_2$ ausgefällt und dann im Dampfstrom über Calciumcarbonat destilliert wurde, wobei der Acetaldehyd in Freiheit gesetzt wird. 200,0 ccm ursprüngliches Gärgut lieferten bei dieser Behandlung 0,4581 g Acetaldehyd. Das sind 52 Proz. der Theorie, berechnet auf die angewendete Menge Brenztraubensäure.

Dieser Befund steht mit früheren Ergebnissen[2]) im Einklange, daß bei Zimmertemperatur von der Schwefligsäureverbindung der Brenztraubensäure bisweilen nur rund die Hälfte zerlegt wird.

b) Eine andere Versuchsreihe wurde deshalb bei 37° angestellt. Der Ansatz wurde folgendermaßen gemacht: 30,0 ccm m-Brenztraubensäure, 30,0 ccm Dinatriumsulfit, 30,0 ccm Acetat-Essigsäurepuffer, 210,0 ccm Wasser, 3 ccm Toluol und 45 g Trockenhefe (Material der Engelhardtbrauerei). Die erwähnten Bestandteile wurden bei 4° zusammengebracht, 10,0 ccm wurden sofort dem Gemisch entnommen und in eine Gasmeßröhre übergeführt. Hauptansatz und aliquoter Anteil kamen alsdann in den Wärmeschrank von 37°.

200,0 ccm Gärgut lieferten nach fünftägiger Digestion 0,6745 g Acetaldehyd oder 76,6 Proz. der Theorie.

Die abgenommenen 10,0 ccm Gärgut hatten in dieser Zeit 19,2 ccm CO_2 (Ablesung bei 18°, 750 mm) entwickelt. Diese wiegen 33,25 mg, entsprechend 75,5 Proz. decarboxylierter Brenztraubensäure. Innerhalb der Fehlergrenze wäre also die gesamte vergorene Menge Brenztraubensäure als Kohlendioxyd und Acetaldehyd wiedergefunden, sofern die titrimetrisch ermittelte Aldehydzahl reinen Acetaldehyd anzeigt, d. h. falls kein Acetoin neben Acetaldehyd vorhanden ist.

c) Zur Klärung des letzterwähnten Punktes war ein Parallelansatz mit den gleichen Substanzmengen unter identischen Bedingungen angestellt. Nach fünftägiger Digestion wurden von der ausgegorenen Maische 250 ccm klar abfiltriert und am Rückflußkühler erwärmt,

---

[1]) Bestehend aus einer wässerigen Lösung von 60 g Eisessig + 272 g $CH_3.COONa.3H_2O$ zu 1 Liter. (B. 53, 1042 ist infolge eines Druckfehlers 72 g Na-Acetat statt 272 g verzeichnet; die richtige Zahl findet sich l. c. S. 1051.)

[2]) B. 53, 1039, 1920.

um gerinnbares Eiweiß zu entfernen. Nach Filtration wurden 200,0 ccm mit absolutem Alkohol auf ein Volumen von 1000 ccm gebracht, wodurch erneut beträchtliche Mengen stickstoffhaltigen Materials ausgefällt wurden. Dann wurde in der Kälte filtriert, der Niederschlag gut mit Weingeist ausgewaschen und das Filtrat mit 5 g p-Nitrophenylhydrazin und 20 ccm 40proz. Essigsäure versetzt. Nach mehrstündigem Stehen wurden 850 ccm Alkohol innerhalb 2 Stunden abdestilliert. Auch bei längerer Aufbewahrung schied sich aus dem Rückstande nur eine sehr geringe Menge eines dunkelviolettroten und in Alkohol unlöslichen Osazons ab. Dasselbe wog nach dem Trocknen 0,037 g und kann nach seinem Schmelzpunkt von 312^0 als p-Nitrophenylosazon des Acetoins angesprochen werden. Seine Menge entspricht 0,0137 g Acetoin.

(Beim Verdünnen der Mutterlauge mit Wasser wurde eine kleine Quantität eines heller roten Osazons erhalten, das sich bei 256^0 zersetzte und wohl als p-Nitrophenyl-glucosazon zu betrachten ist; vermutlich handelte es sich um ein Derivat des Zuckers, der durch enzymatische Hydrolyse aus dem Glykogen der Trockenhefe hervorgegangen war.)

Die Ausbeute an Acyloinderivat war sehr gering; sie belief sich auf nur 2,03 Proz. des vorhandenen gesamten Acetaldehyds, so daß ohne Fehler die durch Titration ermittelte Acetaldehydzahl als Maß für den wirklich entstandenen Acetaldehyd gelten kann.

Es zeigte sich also, daß bei Vergärung der Ketosäure in Gegenwart von Sulfit praktisch aller Aldehyd in die carboxylatische Spaltung hineingezwungen und vor sekundären anderen Umwandlungen bewahrt wurde.

d) 30,0 ccm m-Brenztraubensäure, 30.0 ccm m-Dinatriumsulfit und 30,0 ccm Essigsäure-Natriumacetatpuffer mit 210 ccm Wasser sowie 3 ccm Toluol versetzt. Nach Einrühren von 45 g untergäriger Trockenhefe (Material der Engelhardtbrauerei Berlin) blieben die Ansätze 5 Tage bei Zimmertemperatur stehen; in 200,0 ccm Gärgut waren 0,511 g Acetaldehyd, das ist 58,07 Proz. der theoretisch möglichen Menge, vorhanden.

e) Eine ganz entsprechende Versuchsreihe mit Engelhardt-Trockenhefe bei 37^0 im Brutschrank ergab in 200,0 ccm Gärgut 0,678 g Acetaldehyd, so daß hier 77,04 Proz. der angewendeten Brenztraubensäure umgesetzt waren.

Der gleichzeitig mit Ansatz e) an 10,0 ccm abgezweigten Gärgutes im Gasmeßapparat vorgenommene Sonderversuch führte dazu, daß während der Dauer der Digestion 18,5 ccm CO_2 (19^0, 745 mm) innerhalb 3 Tagen entwickelt wurden. Das entspricht einer Menge von 32,65 mg Kohlendioxyd oder einer Decarboxylierung der Brenztraubensäure zu 74,2 Proz. Die Bestimmung des Acetaldehyds hatte, wie zuvor mit-

geteilt ist, 77 Proz. der theoretischen Möglichkeit geliefert, so daß hier ein unbedeutendes Plus an Acetaldehyd gefunden war. Die Übereinstimmung muß als ausreichend erachtet werden, da die Differenzen an sich innerhalb der Fehlergrenzen liegen und weil hinzukommt, daß ein kleines Manko an Kohlensäure ja infolge Absorption des Gases durch Wasser eintreten kann.

Zur Fahndung auf etwa gebildetes Acetoin wurden in den Ansätzen mit Engelhardt-Trockenhefe 130,0 ccm der ausgegorenen und filtrierten Maische aus dem im Voranstehenden geschilderten Grunde mit 750 ccm Alkohol ausgefällt und das Filtrat samt dem Waschalkohol mit p-Nitrophenyl-hydrazin-acetat versetzt. Nach einigem Stehen wurden 700 ccm Flüssigkeit — hauptsächlich Sprit — innerhalb 2½ Stunden abdestilliert. Aus dem Rückstande schied sich eine winzige Menge Substanz ab, die aus violettstichigen Nadeln bestand und in Alkohol und Äther unlöslich war. Die Menge dieser Verbindung war so spärlich, daß sie eben durch ihren Schmelzpunkt von 312° als p-Nitrophenyl-osazon des Acetoins zu kennzeichnen war.

Bei der Ausführung dieser Untersuchungen standen uns Mittel aus der *Hajime Hoshi*-Stiftung zur Verfügung. Es ist uns ein Bedürfnis, Herrn *Hoshi* und dem *Japanausschuß der Notgemeinschaft der deutschen Wissenschaft* für die gewährte Beihilfe unseren Dank zu bezeugen.

Über die durch Mangan verursachte Eisenchlorose bei grünen Pflanzen.

Von

August Rippel.

(Aus dem landwirtschaftlich-bakteriologischen Institut der Universität Göttingen.)

(Eingegangen am 14. Juni 1923.)

Die Wirkung des Mangans auf die grüne Pflanze ist noch durchaus ungeklärt. Ein notwendiger Bestandteil scheint es nicht zu sein, wenn das auch wohl bisweilen angenommen wird. *van der Haar*[1]) hat z. B. Hedera Helix in manganfreier Nährlösung aus Samen herangezogen und darin normale Oxydase gefunden und präparativ daraus hergestellt, so daß die *Bertrand*sche Theorie[2]) des Mangangehaltes der Oxydase sicher nicht zutrifft. Die Tatsache ferner, daß die Dörrfleckenkrankheit des Hafers auf gewissen alkalischen Böden durch Mangansulfat geheilt werden kann[3]), dürfte wohl auf Umsetzungen im Boden außerhalb der Pflanze, nicht auf ein Fehlen von Mangan in dieser zurückzuführen sein. Weiterhin schreibt man dem Mangan, wozu auch teilweise der eben erwähnte Fall gerechnet wird, eine gewisse Reizwirkung auf die Pflanzen zu, die aber ebenfalls noch durchaus unsicher ist, wenn es sich nicht um Erscheinungen handelt, wie sie sehr viele giftige oder „fremde“ Stoffe in sehr geringen Mengen ausüben.

Beide Fragen sollen uns hier nicht beschäftigen, sondern nur ein dritter Punkt: Sicher ist, daß dem Mangan unter Umständen eine gewisse Giftwirkung zukommt im Sinne einer schädlichen Wirkung auf das Pflanzenwachstum. Die Schädigung trägt das äußere Gepräge einer Chlorose. Daß es sich hierbei um eine Eisenchlorose handelt, vermutet *Czapek*[4]) aus einigen in der Literatur vorliegenden Untersuchungen, die wenigstens so viel erkennen lassen, daß ein gewisser

---

[1]) *A. W. van der Haar*, diese Zeitschr. **113**, 19—38, 1921.

[2]) *G. Bertrand*, C. r. **124**, 1032.

[3]) Vgl. z. B. *R. Scherpe*, Arb. d. biol. Reichsanst. **10**, 307, 1921.

[4]) *F. Czapek*, Biochemie der Pflanzen, 2. Bd., 2. Aufl., S. 500, 502—503. Jena 1920.

Antagonismus zwischen Fe und Mn besteht, derart, daß Mn die Wirkung von Fe herabsetzt. Jedoch fehlt bei diesen Untersuchungen[1]), abgesehen davon, daß der eine (*Pugliese*) nur Längenmessungen angibt, der Nachweis, daß die durch Mn verursachte Schädigung durch verstärkte Fe-Zufuhr wieder geheilt werden kann; außerdem wurden keine Eisenbestimmungen ausgeführt, wodurch der eigenartige Fe-Mn-Antagonismus sich erst genauer wird bestimmen lassen. (Von der unter rein praktischen Bedingungen ausgeführten Untersuchung von *Johnson* kann hierbei wohl abgesehen werden.) Diese Lücken sind in der folgenden Mitteilung ausgefüllt.

Als Versuchspflanze diente Hafer, der in Wasserkultur gezogen wurde; als Nährlösung wurde die *von der Crone*sche Nährlösung verwendet[2]), nur mit dem Unterschied, daß statt Ferro- Ferriphosphat verwendet wurde. Das war für den vorliegenden Zweck sehr von Vorteil, insofern, als eine Eisenchlorose um so leichter auftritt, da die Pflanzen in dieser Lösung an sich schon zur Eisenchlorose neigen. Das zeigte sich beim Hafer in dem vorliegenden Falle vor allem in dem Jugendstadium der Haupt- und Bestockungsprozesse, eine Erscheinung, die jedoch später vorübergeht. Es mag übrigens darauf hingewiesen werden, daß die Eisenaufnahme hier anscheinend nicht aus der Lösung, sondern aus den direkt mit den Wurzeln in Berührung kommenden Eisenphosphatpartikelchen erfolgt. Der Rückgang der anfänglich schwachen Chlorose erklärt sich dann einfach aus der stärkeren Verzweigung des Wurzelsystems, die das Ansiedeln der Teilchen sehr erleichtert. Man nimmt sonst meist Aufnahme aus der Lösung an [vgl. z. B. *Benecke* und *Appel*[3])]. Doch kann diese Frage hier nicht entschieden werden (vgl. auch S. 318 und 323).

Verwendet wurden Flaschen von je 1 Liter Inhalt; jede erhielt zwei vorgekeimte Pflänzchen. Die Flüssigkeit wurde ab und zu, wie üblich, erneuert, natürlich bei allen stets zu gleicher Zeit.

Versuch 1: 12. Mai bis 17. Juni 1922. Samen auf mit Leitungswasser angefeuchtetem Fließpapier vorgekeimt, dann in Reagenzgläser mit wenigen Tropfen Nährlösung weiter gezogen, bis eben das zweite Blatt erschien;

---

[1]) *A. Pugliese*, Sulla biochimica del manganese. Atti reale istituto d'incoraggiamento di Napoli, ser. VI, **65**, 289—315, 1914. *W. E. Tottingham* und *A. J. Beck*, Die Wirkungen von Mangan und Eisen auf die Entwicklung des Weizens (englisch). The plant world **19**, 359—370, 1916; nach Referat in Intern. agrartechn. Rundsch. 1917, S. 366. *M. O. Johnson*, Journ. of Ind. and Engin. Chem. **9**, 47—49, 1917. Auf stark MnO_2-haltigem Boden trat bei Ananas schlechtes Wachstum ein, die Eisenaufnahme soll herabgesetzt gewesen sein; Bespritzen mit Eisenvitriol soll geheilt haben. Ref. Chem. Centralbl. **1**, 280, 1918. *Fr. Weiss*, Kongr. Vet.- og Landbohöshole Aarskrift 1919, S. 239—280; ref. Chem. Centralbl. **3**, 99, 1920. Mangansulfat übt keinen günstigen Einfluß auf das Wachstum aus. Genaueres aus dem Referat nicht erkennbar.

[2]) *von der Crone*, Dissertation Bonn, 1904. Die Lösung enthält auf 1 Liter Wasser 1 g KNO_3, 0,5 g $MgSO_4$ + Aqu, 0,5 g $CaSO_4$ + Aqu, je 0,25 g $Fe_3(PO_4)_2$ und $Ca_3(PO_4)_2$.

[3]) *W. Benecke*, Zeitschr. f. Botanik **1**, 235—252, 1909. *M. Appel*, ebendaselbst **10**, 145—158, 1918.

darauf wurden sie in die Kulturgefäße gebracht, zunächst mit $^1/_{10}$ Nährlösung. Nach 3 Tagen erhielten die einen 0,01 g Mangansulfat . $4\,H_2O$, 6 Tage nach Ansatz in $\frac{1}{2}$ Nährlösung und zum Teil mit 0,025 g $MnSO_4$, 10 Tage nach Ansatz volle Nährlösung, die einen mit 0,05 g $MnSO_4$. Ernte bei beginnender Rispenbildung, die gleichzeitig an je zwei Gefäßen mit und ohne Mangan eintrat.

Das dritte erscheinende Blatt war etwas chlorotisch, anscheinend etwas mehr bei den Manganpflanzen. Nach dem Erscheinen des vierten Blattes verschwanden die chlorotischen Erscheinungen, doch waren die Manganpflanzen schwächer. Charakteristisch war ferner, daß die äußerlich noch sitzenden Spelzenreste (die jetzt entfernt wurden) bei den Manganpflanzen schwarz und verfault aussahen, während sie bei den Pflanzen ohne Mangan nur ganz schwach und farblos verschimmelt schienen; diesen Unterschied zeigten *alle* Pflanzen, die im übrigen jedoch völlig gesund waren. Am 27. Mai beginnt die Bestockung bei zwei Pflanzen ohne Mangan; die Pflanzen mit Mangan sind zweifellos etwas zurück; nach dem Beginn der Bestockung werden wieder chlorotische Erscheinungen besonders an den Bestockungssprossen deutlich sichtbar bei den Manganpflanzen; dies bleibt längere Zeit so; erst vom 9. ab bessern sie sich und sind vom 17. an wieder ziemlich verschwunden bis auf ein Gefäß der Manganpflanzen. Den Trockensubstanzertrag zeigt nachfolgende Tabelle I.

Tabelle I.
Hafer, g Trockensubstanz.

Ohne Mangan		Mit Mangan	
Wurzeln	oberirdische Substanz	Wurzeln	oberirdische Substanz
1,78	4,07	1,59	3,13
1,86	4,16	1,99	4,04
2,20	4,35	1,76	3,43
2,39	4,72	1,88	3,75
2,06 ± 0,116	4,32 ± 0,10	1,81 ± 0,063	3,57 ± 0,15
	Differenz	— 0,25 ± 0,13	— 0,75 ± 0,18
	Gesamtdifferenz	— 1,00	± 0,22

Die Manganpflanzen zeigten also in der oberirdischen Masse einen deutlich geringeren Ertrag (die Differenz übersteigt die wahrscheinliche Schwankung um das 4,2fache), entsprechend den früher während der Vegetationszeit in stärkerem Maße aufgetretenen chlorotischen Erscheinungen. Bei den Wurzeln der Manganpflanzen ist ebenfalls ein Minderertrag festzustellen, doch überschreitet die Differenz nicht die zulässige Schwankungsgrenze (etwa das Zweifache der wahrscheinlichen Schwankung). Die Gesamtdifferenz ist mit dem 4,5fachen der wahrscheinlichen Schwankung als ein Minderertrag der Manganpflanzen

gesichert. In Prozenten ausgedrückt, hätte das Wurzelsystem 12,1, die oberirdische Masse 17,4% durch den Einfluß des Mangansulfats eingebüßt.

Es sei jedoch bei dieser Gelegenheit einmal nachdrücklich darauf hingewiesen, daß derartige Berechnungen oft sehr wenig Wert haben, namentlich, wenn nicht genügend Parallelen vorhanden sind, wie man es bei zahllosen Beispielen in der Literatur findet. Die beträchtlichen wahrscheinlichen Schwankungen sagen uns ohne weiteres, daß das Verhältnis auch umgekehrt sein könnte, wenn nämlich die tatsächlichen Werte bei den oberirdischen Teilen der Manganpflanzen höher, bei den Wurzeln tiefer liegen würden, als wir sie gefunden haben. *Tottingham-Beck* haben übrigens bei der oberirdischen Pflanzensubstanz einen Mehrertrag, bei den Wurzeln einen Minderertrag durch Mangan festgestellt, es liegt nahe, diese Feststellung mit dem Fehlen der wahrscheinlichen Schwankung zu erklären, deren Vorhandensein sofort Aufschluß über die Möglichkeit eines tatsächlichen Mehr- oder Minderertrages gegeben hätte.

Es sollte nunmehr festgestellt werden, ob durch Eisen die Chlorose bei Gegenwart von Mangan behoben werden kann, ob also Mangan nicht etwa eine andere direkte Giftwirkung ausübt.

Versuch 2: 22. Juni bis 8. Juli 1922. Die Pflanzen wurden zunächst wie die von Versuch 1 behandelt, erhielten aber *alle* Mangansulfat, und zwar die doppelte Menge, also 0,05 g in der halben, 0,1 g in der vollen Nährlösung. Am 1. Juli waren alle Pflanzen infolge der stärkeren Mn-Konzentration *äußerst* chlorotisch und schlaff. Am 2. Juli erhielten je drei Gefäße je 0,25 g Fe_2Cl_6, drei weitere zum Ausgleich der Cl-Konzentration die entsprechenden Mengen NaCl; in dieser Lösung blieben sie 3 Tage. Dann wurden sie in die Mangannährlösung zurückversetzt. Die Eisenchloridpflanzen entwickelten sich sehr schlecht und wurden zuerst immer kümmerlicher. Nach einigen Tagen entwickelten sie jedoch schöne tiefgrüne Blätter, während die Wurzeln sich nicht weiter entwickelten; sie blieben (durch Eisen) gebräunt. Versuch abgebrochen.

Eine günstige Eisenwirkung ist also unverkennbar. Die sonstige schlechte Entwicklung der Eisenpflanzen, vornehmlich also ihre Wurzeln, liegt offenbar an der bekannten giftigen Wirkung des Eisenchlorids bei stärkerer Konzentration. Es mag bei dieser Gelegenheit darauf hingewiesen werden, daß diese Giftwirkung sehr wahrscheinlich auf die hydrolytische Spaltung des Eisenchlorids zurückzuführen ist. Die Wurzeln sind tief rötlich braun gefärbt, offenbar von ausgefälltem Eisenhydroxyd; die entstehende Salzsäure wird dabei giftig wirken müssen. Sie scheint aber nach dieser Beobachtung nicht so sehr von der Lösung aus, wie das sonst angenommen wird (vgl. oben), sondern unmittelbar an oder in der Pflanze selbst anzugreifen, wie die dort erfolgte Ausfällung des Eisens zeigt.

Versuch 3: Es wurde nunmehr ein neuer Versuch angesetzt, 10. bis 30. Juli 1922. Der Versuch war wie der vorige; doch wurde Eisen in Form von Eisenhydroxyd in die Nährflüssigkeit gerührt; das Eisenhydroxyd wurde aus Eisenchlorid durch Fällen mit Ammoniak und nachfolgendem Auswaschen bis zum Verschwinden der Chlorreaktion hergestellt. In dieser Eisenlösung verblieben die betreffenden Pflanzen zweimal je 3 Tage.

Vorher waren *alle* Pflanzen *sehr* chlorotisch; die Eisenpflanzen erholten sich sehr schnell und sahen dann schön dunkelgrün aus, während

die übrigen nach wie vor völlig chlorotisch blieben. Äußerer Umstände halber wurde der Versuch nach 3 Wochen abgebrochen; die oberirdische Masse ergab Trockensubstanz (Tabelle II).

Tabelle II.

Ohne Eisen	Mit Eisen
0,19	0,45
0,20	0,44
0,21	0,38
0,21	0,62
0,20 ± 0,01	0,47 ± 0,06
Differenz	+ 0,27 ± 0,06

Man sieht also, was, wie hervorgehoben, schon äußerlich zu erkennen war, daß eine typische Eisenchlorose vorlag. Mangan übt also keine allgemeine Giftwirkung aus, sondern wirkt irgendwie auf die Eisenverbindungen ein, indem es deren *Aufnahme* oder deren *Wirkung* verhindert. Dieser sehr wesentliche, bisher noch nicht beachtete Punkt sollte nun noch geklärt werden durch Bestimmung des Eisengehaltes der erzielten Pflanzen.

Vorerst mag jedoch noch auf etwas anderes hingewiesen werden: Die gesunden (Eisen-) Pflanzen des letzten Versuches (3) zeigten beim Veraschen eine deutlich grüne Asche, also schon ohne weiteres die Manganreaktion. Schmelzen mit Soda und Salpeter ergab eine intensiv grüne Schmelze. Mangan war also in merkbaren Mengen aufgenommen worden. Es ist das immerhin nicht ganz unwichtig zu betonen, da sich die Pflanzen, wie bekannt, sehr verschieden verhalten in ihrem Mangangehalt. Den bekannten Beispielen sei folgendes sehr instruktive noch beigefügt: Der Apfelbaum zeigt qualitativ (Manganschmelze und Kochen der Asche mit Bleisuperoxyd und Salpetersäure zum Nachweis des gebildeten Permanganats) keine Spur von Mangan; die Eberesche dagegen sehr viel; beide wurden von mehreren Standorten untersucht[1]). Darauf wurde ich aufmerksam bei gelegentlicher Aschenuntersuchung der Mistel, die, vom Apfelbaum genommen, keine Spur, von Eberesche erhebliche Manganmengen zeigte. Während also Apfel und Eberesche offenbar ganz verschieden gegen Mangan reagieren, ist die Laubholzmistel indifferent (Tannen- und Kiefermistel zeigen übrigens, ihrem Substrat entsprechend, viel Mangan).

Wäre also Mangan vom Hafer nicht aufgenommen worden, so käme von vornherein hier lediglich eine Verhinderung der *Eisenaufnahme* in Frage; so muß man jedoch noch mit der Verhinderung der *Eisenwirkung* rechnen.

---

[1]) Es sind das also 2 Pflanzen derselben Familie (Rosaceen).

Eisenanalysen zu Versuch 1. Das Eisen wurde kolorimetrisch, in Anlehnung an die von *Willstätter*[1]) angegebene Methode bestimmt. Es wurde von der Substanz des Versuches je 1 g mit 10 ccm Schwefel- und Salpetersäure im Kjeldahlkolben aufgeschlossen, die Lösung auf 50 ccm aufgefüllt und davon 5 ccm mit 1 ccm konzentrierter Salzsäure (eisenfrei; s. weiter unten) versetzt, mit 10proz. Rhodanammonium auf 50 aufgefüllt und mit einer aus Eisenammoniumsulfat hergestellten Lösung von bekanntem Fe-Gehalt kolorimetrisch im Kolorimeter von *Gallenkamp-Heele* verglichen. Zur Herstellung dieser Lösung wurden 0,7 g Eisenammoniumsulfat auf 500 ccm aufgefüllt, nach vorheriger Oxydation mit 25 ccm vorher geprüftem eisenfreien Königswasser (Salpeter- und Salzsäure wurden vorher destilliert; die destillierte HCl auch zu dem obigen Zusatz verwendet) oxydiert, davon 25 ccm auf 500 ccm aufgefüllt und 5 ccm wie oben behandelt und als Vergleichslösung benutzt. Wegen der bald einsetzenden Farbänderung wurde die Vergleichslösung bei jedem Vergleich frisch hergestellt. Ferner wurde der Eisengehalt der gleichen, zum Aufschluß der Substanz verwendeten Salpeter-Schwefelsäuremenge bestimmt und die gefundene Zahl abgezogen. Der Eisengehalt des Rhodanammoniums kam nicht in Frage, da er nicht erkennbar war; im übrigen wäre der Fehler ja auch überall der gleiche, was auch für die Aufschluß-Salpeter- und Schwefelsäure gilt. Die richtigen absoluten Werte ergeben sich ja durch Abzug der blinden Bestimmung (deren Eisengehalt aber natürlich im Interesse der Genauigkeit der Bestimmung nicht allzu erheblich werden darf). Notwendig ist dagegen Eisenfreiheit der zur Vergleichslösung benutzten Reagenzien.

Versuch 1 ergab, nach Abzug von 20 der blinden Bestimmung, die Zahlen der Tabelle III, also *einen völlig gleichen Eisengehalt*, der im Mittel der beiden Zahlen (37,1) 0,0186% Fe oder 0,0534% Fe_2O_3, auf Trockensubstanz bezogen, ergibt.

Tabelle III
(oberirdische Substanz der Tabelle I; gleiche Reihenfolge).

Vergleichslösung	Ohne Mangan	Mit Mangan
100	35	48 +
	42	32
	45 +	32
= 0,00005 g Fe	33 +	30 +
	35,5	38,8

Da nun bei diesem geringen Eisengehalt die Kolorimeterablesungen etwas unsicher erscheinen konnten, wenn auch die Färbung noch

[1]) *R. Willstätter*, Ber. **53**, 1152, 1920.

ausreichend intensiv genug war, so wurden folgende Kontrollbestimmungen ausgeführt: Aus jeder Reihe (mit und ohne Mangan) wurden je 10 ccm in gleich große, ausgesuchte Reaganzgläser abpipettiert, je 5 ccm Rhodanammonium hinzugefügt und die vier Proben einer Reihe so durch einen unbeteiligten Herrn (Herr *Littauer* hatte die Freundlichkeit, diese Ablesungen zu machen) gegen weißes Papier in der Durchsicht von oben verglichen: Es wurde die gleiche Intensitätsordnung wie durch das Kolorimeter gefunden. Weiterhin wurde aus jeder Reihe je die höchste und niedrigste Probe (in Tabelle III mit einem + bezeichnet) auf diese gleiche Weise untereinander verglichen und auch so die früher festgestellte Abstufung gefunden, wie sie sich aus der getrennten Untersuchung ergab, so daß die Werte als völlig sicher gelten können.

Eisenanalysen zu Versuch 3. Von Versuch 3, der auf gleiche Weise untersucht werden sollte, stand nur wenig Material zur Verfügung. Es wurden hier 0,18 g Trockensubstanz (so viel also, wie von der niedrigsten Probe analysiert werden konnte) in kleinen Kölbchen mit 5 ccm konzentrierter Schwefelsäure und 3 ccm konzentrierter Salpetersäure (die in dreimaliger Gabe zugesetzt wurde) aufgeschlossen, auf 25 ccm aufgefüllt und davon 10 ccm mit 10 ccm der obigen Vergleichslösung, wie oben angegeben, im Kolorimeter verglichen. Die entsprechenden Zahlen, nach Abzug von 8 der blinden Bestimmung, finden sich in Tabelle IV.

Tabelle IV
(oberirdische Substanz der Tabelle II; gleiche Reihenfolge).

Vergleichslösung	Ohne Eisen	Mit Eisen
100	10	16 +
	17 +	12
	15	13
= 0,0001 g Fe	11 +	10 +
	13,3	12,8

Auch hier ergaben also beide Reihen *die gleichen Eisenwerte*, im Mittel 13,1 = 0,0182 % Fe oder 0,0521 % Fe_2O_3, auf Trockensubstanz bezogen, mithin also dieselbe Zahl wie in den Analysen zu Versuch 1. Außerdem geht hieraus weiter hervor, daß der prozentige Eisengehalt der äußerst chlorotischen und derjenige der sattgrünen Pflanzen genau der gleiche ist. Absolut ist natürlich, infolge der erhöhten Trockensubstanz, mehr aufgenommen.

Auch bei dieser Reihe wurden die im Kolorimeter erhaltenen Werte in derselben Weise untereinander verglichen (die angekreuzten Werte) wie bei den Analysen zu Versuch 1 mit dem Ergebnis, daß auch hier die Kolorimeterfeststellungen in Hinsicht auf die Abstufung

der gefundenen Werte bestätigt wurden. Es wurden ferner in Reagenzgläsern Versuch 1 und 3 miteinander verglichen auf folgende Weise: Von Versuch 3 (Tabelle IV) wurden von der Reihe ohne Fe von der zweiten Probe (mit der Vergleichszahl 17; in Tabelle IV **Fettdruck**) 5 ccm, von Versuch 1 (Tabelle III) von der Reihe ohne Mn von der zweiten Probe (mit der Vergleichszahl 42; in Tabelle III **Fettdruck**) 3,75 ccm, die mit destilliertem Wasser auf 5 ccm aufgefüllt wurden, miteinander verglichen; auf diese Weise war die Substanzmenge der beiden Proben, die auf die zu vergleichende Lösung entfiel, die gleiche, und beides waren hohe Werte beider Versuche. Es ergab sich absolute Farbengleichheit. Ferner wurde von Versuch 1 dieselbe Probe mit der vierten Probe in Versuch 3 (Tabelle IV, Vergleichszahl 10; in Tabelle IV **Fettdruck**), also einem niedrigen Wert, verglichen: das Ergebnis war schwächerer Farbton der letzteren. Auf diese Weise sind also die Ergebnisse der angeführten kolorimetrischen Eisenbestimmungen relativ und absolut untereinander völlig in den in den beiden Tabellen III und IV niedergelegten Größenordnungen gesichert.

Es geht hieraus mit größter Eindeutigkeit hervor, *daß in dem vorliegenden Falle der relative Eisengehalt der extrem chlorotischen und der sattgrünen Haferpflanzen völlig der gleiche war, daß mithin das Mangansulfat nicht die Eisenaufnahme, sondern die Eisenwirkung verhindert hat.*

Natürlich besteht trotzdem die Möglichkeit, daß unter anderen Verhältnissen Mangan auch eine Eisenaufnahme verhindern kann; wie oben erwähnt, will *Johnson* das festgestellt haben; doch kann ich über seine Methode mangels der Vorlage der Originalarbeit kein Urteil fällen. Die vorliegenden Versuche scheinen mir aber zu zeigen, daß die Verhinderung der Eisen*wirkung* eine wesentlichere Rolle spielt.

Ein kurzer Hinweis auf die Natur der verwendeten Manganverbindung scheint mir noch notwendig zu sein. Es wurde hier Sulfat angewendet. Man kann sich nun leicht davon überzeugen, daß ein Zusatz von Sulfaten zu Eisenchlorid (also von Na_2SO_4, K_2SO_4) sehr schnell und intensiv Eisenhydroxyd ausflockt, während bei einem äquivalenten Zusatz von Chloriden (NaCl, KCl) eine Ausflockung erst nach sehr viel längerer Zeit und dann auch nur in sehr geringfügigem Grade eintritt. Es handelt sich hier zweifellos um die gleiche, vom kolloidalen Eisenoxyd bekannte Erscheinung[1]). Daß in dem vorliegenden Falle, bei der Darreichung des Mangans als Sulfat, eine ähnliche Erscheinung mitspielen könnte, ist jedoch nicht wahrscheinlich, da die verwendete Nährlösung an sich schon sehr sulfatreich ist. Die

---

[1]) *R. Zsigmondy*, Kolloidchemie, 4. Aufl., S. 268 ff. Leipzig, O. Spamer, 1922.

verwendete stärkste Mangangabe betrug 0,1 g $MnSO_4$ + Aqu im Liter bei gleichzeitiger Gegenwart von 0,5 g $MgSO_4$ + Aqu und 0,5 g $CaSO_4$; es ist also wohl ausgeschlossen, daß dies geringe Mehr an Sulfaten die geschilderte vernichtende Wirkung in Versuch 3 gehabt haben könnte. Natürlich müßte man auch weiterhin diese Vorgänge nur im Innern der Pflanze suchen, da, wie Versuch 3 zeigt, Eisenhydroxyd sehr leicht durch die Wurzeln aufgenommen wird. Außerdem haben *Pugliese* mit Mangannitrat, *Tottingham-Beck* mit Manganchlorid ebenfalls die Herabsetzung der Eisenwirkung beobachtet (s. oben).

Welcher Art die Ursachen der geschilderten Manganwirkung sind, kann natürlich nach den vorliegenden Versuchen nicht entschieden werden. Es sei nur darauf hingewiesen, daß chlorotische Erscheinungen offenbar durch eine Anzahl von Kationen hervorgerufen werden können; das war für das Calcium bekannt und ist neuerdings durch *Maiwald*[1]) auch für Kalium, Natrium, Magnesium wahrscheinlich gemacht. Daß die Eisenchlorose bei diesen Elementen jedoch nur bei gewissen Pflanzen bzw. unter gewissen Umständen, d. h. vor allem bei einem großen Überschuß des betreffenden Elementes, eintritt, dürfte ungezwungen mit ihrer Rolle als Pflanzennährstoffe erklärt werden können: Da sie im Stoffwechsel sofort weiter verwendet werden, wird es normalerweise nicht zu einer schädlichen Anhäufung oder Umsetzung kommen. Bei dem stoffwechselfremden Mangan dagegen könnten eben auch geringe Mengen die schädliche Wirkung ausüben. Es sei dann noch darauf aufmerksam gemacht, daß es sich bei den Chlorose hervorrufenden Elementen um solche handelt, die in der Spannungsreihe über dem Eisen stehen; es wäre sehr wünschenswert zu wissen, ob sie deshalb befähigt sind, das Eisen aus den wirksamen Verbindungen in der Pflanze zu verdrängen. Sehr wesentlich von diesem Gesichtspunkte aus wäre es, die schädliche Wirkung des in der Spannungsreihe unter dem Eisen stehenden Kupfers zu kennen, ob also durch dieses Element ebenfalls Chlorose hervorgerufen werden kann oder ob die Schädigungen anderer Natur sind.

Zusammenfassung.

Mangan vermag in Form löslicher Mangansalze in Wasserkultur bei Hafer Chlorose hervorzurufen, die sich durch verstärkte Eisenzufuhr wieder heilen läßt. Der prozentige Eisengehalt der chlorotischen und der sattgrünen Pflanzen ist völlig gleich, so daß also in erster Linie nicht die Eisenaufnahme, sondern die Eisenwirkung durch Mangan verhindert wird.

[1]) *K. Maiwald*, Dissertation Breslau, 1923.

Über die Ernährung der autotrophen Bakterien.

Von

Oscar Loew, München.

(Eingegangen am 16. Juni 1923.)

Es gibt wohl keinen größeren Gegensatz bei den Ernährungsverhältnissen als den der Kohlenstoffassimilation bei grünen Pflanzen und den autotrophen Bakterien. Dort ein komplizierter Apparat mit einer Grundlage von lebendem Protoplasma und einem Farbstoff, der die gelben und roten Strahlen absorbiert und deren spezifische Energie verwerten hilft, hier Abwesenheit eines speziellen Apparates. Dort ist Licht notwendig, hier nicht. Dort Auftreten freien Sauerstoffs, was hier nicht nachweisbar ist. Dort große Wirksamkeit der funktionierenden Vorrichtung, welche bis zu 13000 kg organischer Materie pro Hektar in einem Sommer aus Kohlensäure erzeugen kann, hier aber ein außerordentlich langsamer und schwieriger Vorgang, durch den organische Stoffe selbst kaum grammweise im Laboratorium erzeugt werden können[1]).

Es ist kaum denkbar, daß der Chemismus der Kohlensäureverwertung in beiden Fällen derselbe ist; denn es würde sich wohl kaum ein so komplizierter Apparat wie der Chloroplast phylogenetisch entwickelt haben, wenn die Kohlensäureassimilation auch ohne denselben in einer einigermaßen befriedigenden Art verlaufen könnte.

Da bei der Kohlensäureassimilation der erste organische Körper nur der Formaldehyd sein kann, welcher die Grundlage nicht nur von Kohlehydraten, sondern auch bei der Eiweißbildung[2]) ausmacht, so fragt es sich zunächst, wie können die autotrophen Bakterien aus Kohlensäure Formaldehyd bilden? Offenbar müssen sie viele Moleküle der Substanz oxydieren, ehe es mit Hilfe derselben einmal gelingt,

---

[1]) Ich habe vergeblich versucht, bei nitrifizierenden Bakterien durch Begünstigung der Lebensbedingungen eine einigermaßen erhebliche Menge organischer Substanz zu erzeugen. Bei 6 Liter Nährlösung betrug bei guter Nitrifikationstätigkeit die Menge der erzeugten Bakterienmasse nach 4 Wochen im Dunkeln noch nicht einmal 0,1 g.

[2]) Diese Zeitschr. 41, 224.

der Kohlensäure CO_3H_2 zwei Atome Sauerstoff zu entreißen, deshalb ist gegenüber dem Respirationsvorgang (a) der Reduktionsvorgang bei der Kohlensäure (b) nur gering. Suchen wir diese Verhältnisse durch Gleichungen darzustellen, so haben wir:

Autotrophe Bakterien:

Nitrosomonas[1]:

a) $NH_3 + 3\,O \rightarrow NO_2H + H_2O$.
b) $CO_3H_2 + NH_3 + O \rightarrow \mathbf{CH_2O} + NO_2H + H_2O$.

Nitrobakterium:

a) $NO_2K + O \rightarrow NO_3K$.
b) $CO_3H_2 + 2\,NO_2K \rightarrow \mathbf{CH_2O} + 2\,NO_3K$.

Schwefelbakterien, Beggiatoa usw.:

a) $H_2S + O \rightarrow S + H_2O;\; S + H_2O + 3\,O \rightarrow SO_4H_2$.
b) $CO_3H_2 + 2\,H_2S \rightarrow \mathbf{CH_2O} + 2\,S + 2\,H_2O$.

Thiobacillus denitrificans:

a) $6\,KNO_3 + 5\,S + 2\,CaCO_3 \rightarrow 3\,K_2SO_4 + 2\,CaSO_4 + 2\,CO_2 + 3\,N_2$.
b) $CO_3H_2 + S + O + H_2O \rightarrow \mathbf{CH_2O} + SO_4H_2$.

Hydrogenomonas:

a) $2\,H_2 + O_2 \rightarrow 2\,H_2O$.
b) $CO_3H_2 + 2\,H_2 \rightarrow \mathbf{CH_2O} + 2\,H_2O$.

Der Energie liefernde Prozeß steht in keiner engeren quantitativen Beziehung zum assimilierenden Prozeß. Ist einmal der Formaldehyd gebildet, so wird er sehr rasch, bevor man denselben nachweisen kann, zu Kohlehydrat bzw. Eiweiß weiterverarbeitet.

Was das Bacterium hydrogenomonas betrifft, so hat sein Entdecker *Lebedeff* den Schluß gezogen, daß hier die „Chemosynthese und die Photosynthese ein und derselbe Prozeß" ist, weil das Verhältnis von $O_2 : H_2$ in seinen Versuchen sich zugunsten der Sauerstoffmenge relativ geändert hatte. Allein eine solche Änderung kann auch durch Wasserstoffverbrauch bei der Kohlensäurereduktion herbeigeführt worden sein.

Der Schluß *Lebedeffs* ist um so sonderbarer, als er selbst die interessante Tatsache beobachtete, daß seine Hydrogenomonasbakterien mit Hilfe von Wasserstoff der Kohlensäure Sauerstoff entziehen können. Da bei diesem Versuche freier Sauerstoff abwesend war, war auch die Langsamkeit des Vorganges leicht erklärlich. Denn es fehlte die Unterstützung durch die Energie, welche durch die Respirationstätigkeit gewonnen wird.

[1]) Diesen speziellen Vorgang habe ich schon vor geraumer Zeit einmal im Botanischen Centralblatt besprochen.

Experimentelle Untersuchungen über den Einfluß der Zellsalze auf Eiweißstoffwechsel, Gaswechsel und Körpergewicht.

Von

Kazuo Asada (Kioto, Japan).

(Aus der experimentell-biologischen Abteilung des pathologischen Instituts der Universität Berlin.)

(Eingegangen am 17. Juni 1923.)

Mit 1 Abbildung im Text.

Das Studium des Einflusses von Mineralien auf den Umsatz der organischen Substanz im menschlichen und tierischen Körper ist, wie *Albu* und *Neuberg* (1) schreiben, einer der ältesten Gegenstände der Stoffwechselforschung überhaupt gewesen.

Nachdem in der ersten Hälfte des 19. Jahrhunderts *Barral* (2) bei Schafen durch Kochsalzzufuhr eine Begünstigung der Mästung festgestellt hatte, und im Anschluß daran ähnliche Versuche an Tieren von *Bischoff* (2), *Weiske* (2), *Feder* (2) u. a. ausgeführt worden waren, hat im Jahre 1860 *Carl Voit* (3) am Hunde gefunden, daß mit steigender Kochsalzzufuhr die Quantität der Harnstoffausscheidung sich vermehrt. Erst die Untersuchung der gesamten Stickstoffbilanz hat aber einen endgültigen Aufschluß über die Frage nach der Abhängigkeit des N-Stoffwechsels vom Kochsalz bringen können. Da hat sich dann allerdings die *Voit*sche Lehre, daß das Kochsalz den N-Stoffwechsel steigere und zum Stickstoffansatz führe, nicht in dieser Allgemeingültigkeit aufrechterhalten lassen. Denn die Untersuchungen von *Dubelir* (2) an Hunden, *Gabriel* (2) an Hammeln, *Pugliese* (2) an Hunden, *Pugliese* und *Coggi* (2) bei Menschen stellten nach der Kochsalzzufuhr eine nicht unerhebliche *Verminderung* des Stickstoffumsatzes fest. Dann folgten die Arbeiten von *Straub* (4), von *Rost* (5), von *Gruber* (6) und *Belli* (7), deren Ergebnis im wesentlichen das war, daß kleine Kochsalzmengen eine leichte Förderung des Stickstoffumsatzes verursachen, während größere Kochsalzmengen entschieden stickstoffsparend wirken. Einen gewissen Einfluß hat auf den Ablauf dieser Erscheinungen der Wasserwechsel, indem nur dann größere Kochsalzmengen einen gesteigerten Stickstoffumsatz zur Folge haben, wenn durch eine damit Hand in Hand gehende erhöhte Diurese der Körper Wasser verliert. Wird bei der verstärkten Kochsalzfütterung eine erheblichere Diurese vermieden, so wirkt das Kochsalz stickstoffsparend.

Diese Untersuchungen über die Stoffwechselwirkungen des Kochsalzes waren lange Zeit fast die einzigen, die zu der Frage über den Einfluß

von Mineralien auf den Umsatz der organischen Substanz im Körper vorlagen. Sie beschränkten sich zudem nur auf den Stickstoffwechsel und ließen das Problem, wie weit etwa das Kochsalz auch den Fett- und Kohlehydratumsatz regulieren kann, ganz unberücksichtigt.

Erst in der neuesten Zeit hat man unter dem Eindruck der Errungenschaften der physikalischen Chemie und ihrer Anwendung auf physiologische Probleme der Frage nach der Beeinflussung des Umsatzes der organischen Substanz im Körper durch Mineralien wieder größere Aufmerksamkeit geschenkt und hat, abgesehen von dem Kochsalz, sowohl andere Mineralien in den Kreis der Untersuchung einbezogen, als auch den Einfluß verschiedener Mineralien auf den Umsatz im Körper studiert. Diese Arbeiten wurden vielfach auch im Hinblick darauf unternommen, daß man hoffte, durch sie einen Einblick in den Mechanismus der Mineralwasserwirkungen auf den organischen Stoffwechsel zu gewinnen. Hier sind zu nennen die Arbeiten über den Einfluß von Alkalien und Kalk auf den Harnsäure- und Allantoinstoffwechsel, aus denen sich ergibt, daß unter dem Eindruck der Zufuhr dieser Salze die Harnsäure- und Allantoinausscheidung vermindert wird, während die gesamte Stickstoffbilanz unverändert bleiben kann, wenn diese Salze, wie es bei den Versuchen geschah, in mäßigen Mengen gegeben wurden [*Starkenstein* (8), *Miyadera* (9), *Kaplan* (10), *Hirsch* und *Aufrecht* (11), *Mustafa Kemal* (12), *Bickel* und *Mustafa Kemal* (13) u. a.].

Hierher gehören die Arbeiten von *Zuntz*, *Mäder*, *Misch* und *Bing* (14), aus denen hervorgeht, daß Anionen in bescheidenen Mengen eine Vermehrung des Sauerstoffverbrauchs und eine Steigerung des respiratorischen Quotienten bewirken, während den Kationen ein solcher Einfluß nicht zuzustehen scheint; hierher gehören auch die Arbeiten von *Arnoldi* (15), *Arnoldi* und *Roubitschek* (16), wie von *Arnoldi* und *Ettinger* (17), *Paul Mayer* (18), *Lorant* (19) u. a. über die Herabsetzung des Blutzuckers durch bestimmte Mineralien und die Beobachtungen von *Rubner* und *Rost* (20) über die Beförderung der Fettoxydation durch borsaure Salze und von *Loewy* (21) über die gleiche Wirkung der Alkalien. Hier ist auch der Ort, an die *Arnoldi*sche Auffassung von der regulatorischen Bedeutung der Mineralstoffe für den Antransport von Brennstoffen aus dem Blute in die Gewebe, wie für den Abtransport der Stoffwechselschlacken nach außen zu erinnern.

Diese Literaturangaben, die auf Vollständigkeit keineswegs Anspruch[1]) machen, mögen genügen, um das innige Ineinandergreifen des Mineralstoffwechsels und des Stoffwechsels der organischen Körpersubstanz zu illustrieren. Die Mineralstoffe kommen ebenso wie der Stickstoff erst im Zusammenwirken mit den Kohlenstoffverbindungen, die nach dem Wasser die Hauptmasse des Körpers ausmachen, zu physiologischer Bedeutung. Der Kohlenstoff ist der feste Angelpunkt, um den sich das ganze Geschehen im Körper dreht. In derjenigen Substanz, die letzten Endes der Träger alles Lebens ist, nämlich in den lebendigen Eiweißmolekülen, ist der Kohlenstoff mit Stickstoff verkettet, und in diese Bindungen greifen wieder ein die Mineralien,

[1]) Literatur findet sich bei *Noorden-Salomon*, Allgemeine Diätetik. Verlag Julius Springer, 1920. *Ragnar Berg*, Die Vitamine. Verlag S. Hirzel, 1922.

so wie sie es auch bei den stickstofffreien Kohlenstoffverbindungen tun können. Teils sind sie in den Eiweißmolekülen fest verankert, teils haften sie ihnen locker an und werden beim zellulären Stoffwechsel abgesprengt und in Freiheit gesetzt oder wieder eingefügt. Die Mineralien finden sich dann in der intra- und perizellulären Flüssigkeit: die Anwesenheit ihrer Ionen innerhalb der Eiweißmasse verleiht dieser geradezu ihren kolloidalen Charakter [*J. Loeb* (22)], teilt ihr elektrische Ladungen mit, wirkt bestimmend auf den osmotischen Druck und die Viskosität des Eiweißes, durch den Eintritt neuer Ionen in das Zellinnere werden Änderungen in den elektrischen Ladungen des kolloidalen Eiweißes hervorgerufen, dadurch können Ausflockungen am Eiweiß entstehen oder ausgeflockte Teile können wieder in den kolloidalen Zustand zurückgeführt werden. Aber auch durch das Vorüberziehen der Ionen an den Zellen und ihr Inbeziehungtreten mit den Zellgrenzflächen [*Höber* (23)] können in den elektrischen Ladungen der Grenzmembranen oder auch indirekt im Zellinnern Veränderungen hervorgerufen werden, wie denn endlich auch der Durchtritt der Ionen durch die Membran zur Entstehung freier elektrischer Ladungen zu führen vermag. Wir sehen also, welche Fülle physikalisch-chemischer Erscheinungen schon die bloße Anwesenheit der Ionen, ihr Vorüberziehen an den Zellen oder ihre Passage durch die Zellen am Zelleiweiß macht, ganz abgesehen von der Tatsache, daß mineralische Bestandteile geradezu auch eine Komponente im Aufbau von Eiweißmolekülen sein können. Wenn es auch trotz der Fülle der Tatsachen, die die physikalische Chemie der letzten Jahrzehnte zu diesen Fragen des Stoffwechsels beigebracht hat, noch nicht geklärt ist, in welcher genaueren Art und Weise nun die Mineralien, die ja kaum Energiequellen im Körper, sondern im wesentlichen nur Energievermittler [*Koeppen* (24)] sind, fördernd oder hemmend oder richtunggebend auf die Umsetzungen innerhalb der organischen Substanz, auf Anbau und Abbau derselben in ihrem Stoffwechsel einwirken, so kann nach Maßgabe der schon vorliegenden Erfahrungen die Tatsache einer solchen Einwirkung nicht geleugnet werden. In einem Vortrage auf der Naturforscherversammlung 1922 hat *Spiro* (25) unsere derzeitigen Kenntnisse zu diesem Gegenstande zusammengefaßt.

Ganz allgemein hat man nun die Frage nach dem Einfluß von Mineralien auf den Umsatz der organischen Substanz in zwei Teile zu gliedern, nämlich erstlich in die Doppelfrage, wie sich dieser Stoffwechsel verhält, wenn die Nahrung an Mineralien insuffizient ist, und wie der Stoffwechsel sich ändert, wenn man nunmehr die fehlenden Mineralien zugibt, zweitens aber in die Frage, wie bei einer an Mineralien suffizienten Nahrung eine Zulage von Mineralien auf den Stoffwechsel einwirkt.

Bei einer solchen Untersuchung bleibt es aber bei der Ausdeutung der Versuchsergebnisse, auch wenn sich die Experimente nur mit einem einzigen Mineral befassen, immer eine schwierige Aufgabe, „für ein Element“, wie *Pfeffer* (26) sagt, „genau die wahre Bedeutung und die speziellen und generellen Funktionen zu präzisieren, die keineswegs ohne weiteres durch denjenigen Erfolg verraten werden, den die Entziehung des Elementes zur Folge hat“. Dasselbe gilt natürlich auch für den Fall, daß ein Element im Überschuß dem Körper bei derartigen Versuchen zugeführt wird. „Denn bei der innigen Verkettung des ganzen Getriebes werden durch die Sistierung oder die abnorme Gestaltung einer einzelnen Tätigkeit alle übrigen Funktionen in Mitleidenschaft gezogen, und so gestaltet sich vielleicht gerade eine Reaktion besonders auffällig, in welche das fragliche Element gar nicht eingreift.“ Schon die korrelative Verkettung im Organismus bringt es mit sich, daß ein Element in vielfacher Hinsicht auslösende Wirkungen erzielt.

Gerade im Hinblick auf diese Erwägungen schien es gar nicht einmal zweckmäßig, zunächst nur ein einzelnes Mineral bei meinen vorliegenden Versuchen heranzuziehen. Ich habe vielmehr, da bereits der Einfluß des Hauptrepräsentanten der Salze in den zirkulierenden Säften, nämlich des Kochsalzes, auf den Stoffwechsel der organischen Substanz vielfach untersucht worden war, die ganze Gruppe der sogenannten Zellsalze in toto zu meinen Experimenten herangezogen.

Man kann bekanntlich die Mineralien des Körpers in zwei Gruppen sondern, einmal in sogenannte *zirkulierende Mineralien*, deren Hauptrepräsentant Kochsalz und Calcium sind, besonders das Kochsalz, da es eine große Wanderungsfähigkeit im Körper zeigt und vor allem in der Körperflüssigkeit sich vorfindet; dann aber zweitens in sogenannte *Zellsalze*, die sich vornehmlich in den Zellen des Körpers, und zwar vielfach gerade in dem Zellkern verankert finden, und die jedenfalls einen integrierenden Bestandteil des zellulären Gebäudes darstellen. Zu diesen Mineralien gehört vor allem das Kalium, das Magnesium, Eisen und der Phosphor, aber auch in begrenztem Umfange das Calcium.

Während wir nun über den Einfluß des Kochsalzes auf den Stickstoffumsatz, wie ich eingangs zeigte, hinreichend unterrichtet sind, wissen wir eigentlich noch verhältnismäßig wenig über den Einfluß dieser letztgenannten Zellsalze auf den Stoffwechsel der organischen Substanz. Insonderheit fehlen Paralleluntersuchungen zu jenen Versuchen mit dem Kochsalz, in denen der Einfluß des Mangels und der Zufuhr von diesen Zellsalzen auf den Stickstoffumsatz und das Körpergewicht geprüft wird, alles natürlich bei vorhandener genügender Kochsalzspeisung des Organismus.

Bei derartigen Stoffwechseluntersuchungen muß man aber ein Moment berücksichtigen, das in früheren Versuchen dieser Art meistens

unbeachtet blieb, nämlich den *Vitamingehalt* der Nahrung. Will man den Einfluß einer salzarmen Kost auf den Stoffwechsel prüfen, so muß diese Kost genügende Vitaminmengen enthalten, besonders wenn sich der Versuch über eine längere Zeit erstreckt. Das kompliziert natürlich die Versuchsanordnung.

Bei meinem Versuche, den ich an einem Hunde anstellte, habe ich als Grundnahrung folgende Kost gewählt:

Reines Weizeneiweiß[1]	40,00 g
Polierter Reis	60,00 g
Butter (etwa 30,8 g Fett)	35,00 g
Frischer Citronensaft	60,00 g
Kochsalz	3,00 g
Aqua destillata	550,00 ccm

Die Kost wurde so zubereitet, daß der Reis mit 750 ccm destilliertem Wasser gekocht wurde, wobei etwa 200 ccm verdampften. Dann wurde diesem Reisbrei nach der Abkühlung das Weizeneiweiß, die Butter und der Citronensaft und das Salz zugemischt. Die gesamte Flüssigkeitsmenge, die das Tier täglich erhielt, betrug unter diesen Umständen etwa 600 ccm.

Nach einer Mitteilung aus dem physiologischen Institut der Tierärztlichen Hochschule gelten für den Kalorienbedarf der Hunde, gleichviel ob es sich um vegetarische oder animalische Kost handelt, folgende Werte:

Körpergewicht kg	Kalorienzahl	Körpergewicht kg	Kalorienzahl
8	510	12	670
9	550	13	700
10	590	14	740
11	630	15	775

Mein Hund wog, als ich ihn in den Versuch einstellte, 10 kg. Der Kaloriengehalt der Grundnahrung betrug 663 Kalorien. Das Tier bekam also, auf sein Körpergewicht berechnet, unter Zugrundelegung der obigen Tabelle etwa 73 Kalorien zu viel. Es war also jedenfalls kalorisch überreichlich ernährt.

Die Vitamine erhielt der Hund in der Butter und im Citronensaft. Ich hatte nun anfangs nicht 60 g, sondern nur 30 g Citronensaft gegeben. Diese Menge enthielt zu wenig Vitamin für den Körper, was daraus hervorging, daß der Hund zunächst trotz der kalorisch-suffizienten Nahrung an Körpergewicht sukzessive abnahm. Sein Körper-

[1]) Das Weizeneiweiß war mir von der chemischen Fabrik von Dr. *Klopfer* (Dresden-Leubnitz) in dankenswerter Weise zur Verfügung gestellt worden.

gewicht sank von 10020 auf 8450 g innerhalb von 77 Tagen. Die tägliche N-Bilanz änderte sich allerdings in dieser Zeit nur wenig, sie wurde aber immerhin allmählich mehr und mehr negativ.

In je 7-Tage-Perioden zeigte sie folgende Werte:

— 0,0197 g N	+ 0,5158 g N
+ 0,5095 g N	+ 0,3748 g N
+ 0,4562 g N	— 0,0754 g N
+ 0,3218 g N	— 0,3020 g N
+ 0,4290 g N	— 0,3190 g N
+ 0,4672 g N	

Dieser Verlauf des Versuches ließ in mir den Verdacht aufkommen, daß der Vitamingehalt zu gering sei. Ich legte nun der Grundnahrung vom 78. Versuchstage an täglich im ganzen 60 g Citronensaft zu und erreichte dadurch, daß vom 78. bis zum 104. Versuchstage das Körpergewicht fast absolut konstant blieb. Es betrug am 77. Versuchstage 8450 g und am 104. Versuchstage 8500 g. Die N-Bilanz zeigte in dieser Zeit in den einzelnen 6- bis 7-Tage-Perioden folgende Werte:

+ 0,0735 g N
+ 0,3349 g N
+ 0,3086 g N
+ 0,3181 g N

Es war also durch die Zulage von 30 g Citronensaft mehr als vorher erreicht worden, daß das Körpergewicht auf gleicher Höhe blieb, und daß die tägliche Stickstoffbilanz, die eine deutliche Tendenz zur Negativität angenommen hatte, sofort leicht positiv wurde und nur innerhalb enger Grenzen Schwankungen bei positiven Werten erkennen ließ. Am 104. Versuchstage befand sich also der Hund zweifellos genau im Körpergewichts- und Stickstoffgleichgewicht. Auf die Bedeutung dieser Erfahrungen für die Vitaminlehre behalte ich mir vor, noch an anderer Stelle etwas ausführlicher zurückzukommen.

Der Versuch, über den ich in der vorliegenden Arbeit berichten will, beginnt also eigentlich erst am 78. Versuchstage, von dem an das Tier genügende Vitaminmengen mit der Grundnahrung erhielt. Da das Körpergewicht des Tieres an diesem Tage 8450 g betrug, die Nahrung aber 663 Kalorien hatte, bekam der Hund nach der obigen Kalorientabelle einen Überschuß von etwa 133 Kalorien. Er erhielt also zu viel Nahrung für sein Körpergewicht und blieb trotzdem bei Gewichtskonstanz und N-Gleichgewicht. Man hätte erwarten können, daß er bei dieser Kost an Gewicht zunähme.

Nun hatte das Tier vom 1. bis zum 78. Versuchstage mit der Nahrung nur deren natürlichen Salzgehalt und die tägliche Kochsalzzulage von 3 g erhalten. Auch vom 78. bis 104. Versuchstage wurde daran nichts geändert. Wie aus folgender Berechnung hervorgeht, war diese Grundnahrung des Tieres sehr arm an Zellsalzen.

Gramm	CaO	MgO	FeO	SO_3	P_2O_5	Na_2O	K_2O	Cl	Gesamtasche g
60 g Zitronensaft	0,0119	0,0099	0,0248	0,0969	0,0958	0,0181	0,0762	0,0179	0,3614
40 g Weizeneiweiß . . .	0,0060	0,0640	0,0134	—	0,0607	0,0755	0,0531	—	0,3160
60 g polierter Reis . . .	0,0066	0,0228	0,0010	0,0012	0,1104	0,0114	0,0420	0,0002	0,3900
Summa	0,0245	0,0967	0,0392	0,0981	0,2669	0,1050	0,1713	0,0181	1,0674

Die Butter, die das Tier erhielt, war praktisch salzfrei. — Es ist nun zunächst bemerkenswert, daß der geringe Gehalt der Nahrung an Zellsalzen bei eben hinreichender Vitaminzufuhr genügte, um das Stoffwechselgleichgewicht des Tieres aufrechtzuerhalten.

Vom 105. bis 146. Versuchstage bekam das Tier zu der Grundnahrung mit ihren 3 g Kochsalz noch folgende Zulage:

CaO	0,3909 g
MgO	0,2400 g
FeO	0,0950 g
P_2O_5	0,4950 g
K_2O	0,2276 g
J	in Spuren
Summa . .	1,4485 g

Diese Salze wurden in Form eines Salzgemisches gegeben, das folgende Zusammensetzung hatte:

Calcium phosphoricum	100,00 g
Magnesium citricum	100,00 g
Kalium chloratum (KCl). . . .	15,00 g
Ferrum citricum	30,00 g
Jod	0,05 g
Jodkali.	0,10 g

Das Tier erhielt nun im ganzen folgende Zellsalzmengen täglich, die in 3 g dieses Salzgemisches und in der Speise enthalten waren:

CaO	0,4154 g
MgO	0,3367 g
FeO	0,1342 g
P_2O_5	0,7619 g
K_2O	0,3989 g
Summa . .	2,0471 g

Der Gehalt der Nahrung an Zellsalzen war also jetzt um das Zwei- bis Dreifache von demjenigen Werte vermehrt worden, den sie vorher gehabt hatte. Da das Tier nun täglich nach dem Kochen des Reises in der Nahrung etwa 550 ccm Wasser und 60 g Citronensaft, also rund 600 ccm Wasser erhielt, und mit der Grundnahrung einschließlich der ihr zugehörigen 3 g Kochsalz etwa 4 g Salz im ganzen bekam, später

aber bei der Zellsalzzulage im ganzen auch nicht mehr als etwa 7 g Salz empfing, so entsprach die Lösung in dem gesamten Nahrungsgemisch etwa einer Lösung mit dem Gefrierpunkte — 0,45° C, und im zweiten Falle einer Lösung mit dem Gefrierpunkte von — 0,53° C. Es war also das Wasser der Nahrung bei dieser leichten Bluthypotonie der Lösungen sicher genügend, um die Salzausscheidung durch die Nieren zu regulieren. Das geht auch daraus hervor, daß der Hund in der Periode, in der er die Zellsalze, also die erhöhte Salzzulage erhielt, eine durchschnittliche tägliche Harnmenge von 459 ccm bei täglichem Kotwasser von 12 g hatte, die zwar niedriger war als die entsprechende Harnmenge in der voraufgehenden Periode, in der das Tier nur die 3 g Kochsalz mit der Nahrung erhalten hatte (Harnmenge 549 ccm, Kotwasser 14 g), die aber etwas höher war als die Harnmenge mit dem Kotwasser der auf die Zellsalzzulage folgenden Periode, in der wieder nur die 3 g Kochsalz allein mit der Nahrung gegeben wurden (Harnmenge 427 ccm, Kotwasser 7 g). Diese Zahlen der täglichen Harnmengen in den verschiedenen Perioden beweisen, daß durch die Zellsalzzulage die Wasserausscheidung durch den Harn nicht in spezifischer Weise beeinflußt wurde. Denn es stieg ja nach dem Wegfall der Zellsalze die Harnmenge nicht wieder an, sondern verminderte sich eher noch etwas. Als darauf in einer noch späteren Periode das Tier zu den 3 g Kochsalz der Nahrung noch 3 g Chlorkalium zugelegt erhielt, erreichte die tägliche Harnmenge auch nur den Wert von 456 ccm, d. h. sie war fast genau ebenso hoch wie in der Periode, in der alle Zellsalze gegeben wurden. Es folgt aus alledem, daß die Vermehrung der Nahrungssalze um 3 g bei den dargereichten destillierten Wassermengen keinen wesentlichen Einfluß auf die Wasserausscheidung durch die Nieren und auch nicht durch den Kot gehabt hat. Einmal trat durch die vermehrte Salzzulage eine Verminderung um etwa 90 ccm, das andere Mal eine Vermehrung um etwa 30 ccm Harn ein.

Es können ferner auch sogenannte allgemeine Wasserwirkungen oder allgemeine Salzwirkungen im Hinblick auf alle diese quantitativen Verhältnisse keine Rolle bei dem Zustandekommen der Erscheinungen am Stoffwechsel der organischen Substanz in den verschiedenen Perioden gespielt haben. Dasjenige, auf das es hier ankommt, ist, zu zeigen, daß weder durch stärkere Diuresen, noch auch durch stärkere Einschränkungen der Harnmengen in den Perioden der erhöhten Salzzulagen im Körper Verhältnisse geschaffen worden waren, die als abnorme Zustände angesprochen werden müßten, entweder als Zustand einer abnormen Wasserabgabe oder einer abnormen Wasserretention. Es kommt darauf an, zu zeigen, daß die Harnmengen in allen Perioden sich mit ihren Schwankungen innerhalb der physiologischen Breitengrenzen bewegten, und daß durch die Gabe der kleineren oder größeren

Salzmengen keine Verhältnisse geschaffen wurden, die durch sekundäre Störungen im Wasserhaushalt den Organismus in robuster Weise aus der Bahn des physiologischen Geschehens herausreißen konnten.

Ich knüpfe nun nach dieser Abschweifung auf das methodologische Gebiet wieder an jene Beobachtung an meinem Versuchstiere an, die besagt, daß das Tier nach einer langen Vorperiode von 104 Tagen, in der es außer dem spärlichen Zellsalzgehalt der Nahrung lediglich 3 g Kochsalz täglich erhielt und seit 26 Tagen auch genügende Vitaminmengen dazu erhalten hatte, genau im Körpergewichts- und Stickstoffgleichgewicht war, obschon es einen Nahrungsüberschuß von 133 Kalorien empfing. Das Tier hätte also eigentlich an Gewicht zunehmen und eine stärker positive N-Bilanz bekommen müssen. Daß es das nicht tat, konnte zwei Ursachen haben. Entweder war der Vitamingehalt der Nahrung immer noch insuffizient, oder es war die Zellsalzarmut der Nahrung der Grund für dieses eigentümliche Verhalten des Tieres.

Der Beweis, daß nun in der Tat der Zellsalzmangel die Schuld an der ungenügenden Ansatzfähigkeit des Körpers für die Nahrung, die sich in Stickstoff- und Körpergewichtsgleichgewicht bei übermäßiger Kalorienzufuhr ausdrückte, trug, konnte aber dadurch erbracht werden, daß die Zulage von Zellsalzen in der folgenden Periode sofort eine Gewichtszunahme und eine allmählich stärker werdende positive N-Bilanz auslöste. In dieser Periode der vermehrten Zellsalzzulage zeigte das Tier einen wahren Heißhunger, es verschlang die Nahrung mit größter Gier und fraß außerdem sehr häufig seinen eigenen Kot auf. Das zeigt, daß durch die Zellsalzzugabe auch der Appetit des Tieres enorm mußte gesteigert worden sein; wenn man es nach Belieben hätte fressen lassen, hätte es zweifellos stark an Körpergewicht zugenommen. Aber es bekam immer die gleiche Kalorienmenge. Es wurde so innerhalb des Rahmens der immer gleichen Kalorienzufuhr erreicht, daß die Nahrung nicht einfach den Stoffwechsel passierte, sondern auch im Körper zum Ansatz kam. Diese Periode der vermehrten Zellsalzgabe dauerte vom 105. bis 146. Versuchstage.

Das Körpergewicht stieg von 8500 g am 105. Versuchstage auf 8900 g am 146. Versuchstage an. Die täglichen N-Bilanzen hatten in den einzelnen Unterabschnitten dieser Periode folgende Werte:

Versuchstag	105	bis	110	+ 0,1365 g N
,,	111	,,	116	+ 0,5414 g N
,,	117	,,	122	+ 0,5722 g N
,,	123	,,	128	+ 0,7379 g N
,,	129	,,	134	+ 1,2988 g N
,,	135	,,	140	+ 1,1330 g N
,,	141	,,	146	+ 1,2191 g N

Nun wurde dem Tiere die Zellsalzzulage vom 147. bis zum 176. Versuchstage wieder entzogen.

Das Körpergewicht sank von 8900 auf 8270 g am 176. Versuchstage. Die tägliche N-Bilanz näherte sich wieder dem Nullpunkte, wie die folgende Zusammenstellung zeigt:

Versuchstag	147	bis	151	+ 0 7072 g N
,,	152	,,	157	+ 0,5670 g N
,,	158	,,	163	+ 0,3803 g N
,,	164	,,	169	+ 0,3577 g N
,,	170	,,	176	+ 0,1504 g N

Aus diesen Beobachtungen geht hervor, daß eine Vermehrung des Zellsalzgehaltes der Nahrung eine Steigerung des Körpergewichtes und eine Stickstoffretention, eine Verminderung des Zellsalzgehaltes der Nahrung aber eine Abnahme des Körpergewichtes und einen Rückgang der Stickstoffretention bedingt.

Ich habe weiterhin mit der dankenswerten Unterstützung von Herrn Prof. *A. Loewy* und Herrn Dr. *Arnoldi* den Gaswechsel bei diesem Tiere in den verschiedenen Perioden untersucht. Die Untersuchung fand beim nüchternen Tiere mit Hilfe des *Zuntz-Geppert*schen Respirationsapparates statt[1]).

In der ersten Periode des Körpergewichtes- und N-Gleichgewichtes ohne Zellsalzzulage wurde der Gaswechsel am 97. Versuchstage gemessen. Eine zweite Messung fand statt in der Periode, in der das Tier die Zellsalzzulage erhielt, am 128. Versuchstage. Eine dritte Messung nahm ich vor am Ende der Periode, in der dem Tiere wieder die Zellsalze entzogen worden waren, nämlich am 176. Versuchstage.

---

[1]) Ich füge hier auch die Gaswechselversuche aus der Periode an, in der die für das Tier erforderliche Citronensaftmenge ausprobiert wurde, weil diese Versuche sehr schön die oxydationssteigernde Wirkung des Citronensaftes illustrieren.

7. Versuchstag: Körpergewicht 9870 g, O_2-Verbrauch in 1 Minute 6,53 ccm, respiratorischer Quotient 0,7324. Vitaminarme Ernährung bei größerem Vitaminvorrat des Körpers.

25. Versuchstag: Körpergewicht 9350 g, O_2-Verbrauch in 1 Minute 5,25 ccm, respiratorischer Quotient 0,7100. Vitaminarme Ernährung während längerer Zeit.

59. Versuchstag: Körpergewicht 8820 g, O_2-Verbrauch in 1 Minute 6,06 ccm, respiratorischer Quotient 0,6820. Vitaminarme Ernährung während längerer Zeit.

97. Versuchstag: Körpergewicht 8500 g, O_2-Verbrauch in 1 Minute 7,06 ccm, respiratorischer Quotient 0,7297. Vitaminreiche Ernährung.

Die Steigerung im O_2-Verbrauch am 59. Tage gegenüber dem 25. Tage erklärt sich daraus, daß das Tier vor dem 25. Tage eine kürzere Zeit vitaminfreie Margarine statt Butter erhalten hatte. Diese Angabe ist in der Tabelle fortgelassen worden, um die Diskussion der Versuchsergebnisse nicht unnötig zu komplizieren.

Gaswechsel am 97. Versuchstage bei einem Körpergewicht von 8500 g, O_2-Verbrauch pro Minute 59,98 ccm, pro Kilogramm in 1 Minute 7,06 ccm. Respiratorischer Quotient 0,7297.

Gaswechsel am 128. Versuchstage bei einem Körpergewicht von 8610 g, O_2-Verbrauch pro Minute 67,11 ccm, pro Kilogramm in 1 Minute 7,79 ccm. Respiratorischer Quotient 0,7391.

Gaswechsel am 176. Versuchstage bei einem Körpergewicht von 8270 g, O_2-Verbrauch pro Minute 58,29 ccm, pro Kilogramm in 1 Minute 7,05 ccm. Respiratorischer Quotient 0,6710.

Aus diesen Zahlen geht hervor, daß durch die Zellsalzzulage eine Steigerung der Oxydation herbeigeführt wurde; diese Beobachtung stimmt mit dem Resultat der in der Einleitung erwähnten Versuche von *Loewy* über die oxydationssteigernde Wirkung von Alkalien und demjenigen von *Rost* und *Rubner* über die gleiche Wirkung von borsauren Salzen überein.

Es ist nun auffallend, daß die Zellsalze trotz der Steigerung der Oxydation und trotz des sich darin ausdrückenden verschärften Umsatzes der Fette und Kohlehydrate zu einer Körpergewichtsvermehrung Veranlassung gegeben haben. Die sich unter der Zellsalzgabe einstellende Steigerung der N-Retention deutet gewiß darauf hin, daß der Körper an stickstoffhaltigem Material reicher geworden ist.

Der Hund hat zwar dauernd während des ganzen Versuches Spuren von Stickstoff retiniert. Während der Periode der Zellsalzzulage trat aber allemal eine wesentliche Erhöhung dieser Stickstoffretention ein. Wenn der Zellsalzgehalt der Nahrung vermindert wurde, ließ sofort die Stickstoffretention nach und sank auf ganz minimale Werte. Im Hinblick auf die Körpergewichtskurve des Hundes ist nun diese Stickstoffretention keineswegs mit entsprechender Wasserretention, wie es bei einer der beobachteten Stickstoffretention entsprechenden Protoplasmavermehrung hätte der Fall sein müssen, parallel gegangen. Mag auch in der Periode der Zellsalzzulage der Körper etwas wasserreicher geworden sein, so ist er doch ganz unverhältnismäßig reicher an Stickstoff geworden. Dieser retinierte Stickstoff könnte nun einmal zu einem stickstoffreicheren Protoplasma oder partiell zu einer Protoplasmaneubildung geführt haben, also zum Ansatz gekommen sein, oder aber er könnte als zirkulierender Stickstoff in der Körperflüssigkeit gekreist haben. Dann müßte wohl auch der Reststickstoff des Blutes angewachsen sein. Wenn auch darüber noch besondere Versuche anzustellen sind, so hat es doch besonders im Hinblick auf die Länge der Versuchsperiode mit erhöhter Stickstoffretention größere Wahrscheinlichkeit, wenn man annimmt, daß dieser Stickstoff mindestens zum Teil in irgend einer Form angesetzt worden ist, oder daß die Stickstoffzersetzung in den Zellen gehemmt worden ist.

Da weiterhin, wie wir sahen, während der Zellsalzperiode die Oxydation gesteigert war, was in erster Linie auf eine gesteigerte Fettverbrennung hinweist, so könnte wohl der Körper an Fett verloren haben. Es hätte das zu einem Gewichtsverlust des Körpers führen müssen. Wenn nun, wie es tatsächlich der Fall war, der Körper im Gegensatz zu dieser Schlußfolgerung an Gewicht zunähme, so müßte durch andere Faktoren der Gewichtsverlust durch die Fettzerstörung nicht nur ausgeglichen, sondern sogar übertroffen werden. Das war möglich, wenn neben der Stickstoffanreicherung des Körpers in der Zellsalzperiode auch eine gewisse, aber beschränkte Wasserretention stattfand. Diese kann zwar nur gering gewesen sein nach Maßgabe der Körpergewichtszunahme, und da, wie ich zeigte, durch die Zellsalzzulage die Harnmengen und auch das Kotwasser nicht wesentlich in einer bestimmten Richtung beeinflußt wurden. Aber mangels eines genauen Wasserbilanzversuches und unter Berücksichtigung der Regulierung des Wassergehaltes des Körpers durch die Lungen und die Haut muß doch die Möglichkeit zugegeben werden, daß mit der Zellsalzzulage und mit der Stickstoffretention auch in bescheidenem Umfange eine Wasserretention stattgefunden hat. Ob das Wasser nun im Verein mit einer bestimmten Quote des Retentionsstickstoffs zur Neubildung von Protoplasma benutzt wurde, oder ob nur das vorhandene Protoplasma stickstoffreicher geworden ist, sei es durch vermehrte Stickstoffaufnahme oder verminderten Stickstoffzerfall oder durch beides, während das Wasser lediglich eine gewisse Quellung des Protoplasmas oder eine stärkere Füllung der Interzellularräume und eine Vermehrung der zirkulierenden Säfte verursachte, oder ob alle diese Vorgänge nebeneinander stattgefunden haben, läßt sich kaum entscheiden. Es ist hier noch daran zu erinnern, daß durch die Steigerung der Fett- und Kohlehydratverbrennung in der Mineralsalzperiode indirekt Stickstoff gespart worden sein kann.

Das Wesentliche ist, daß in der Zellsalzperiode unverhältnismäßig mehr Stickstoff als Wasser retiniert wurde und daß in der Nachperiode keine Diurese im Harn auftrat.

So muß aus allen meinen Beobachtungen der allgemeine Schluß gezogen werden, daß durch die Zellsalze die Oxydation und damit die Verbrennung der Fette und Kohlehydrate gesteigert wird, daß aber gleichzeitig der Körper stickstoffreicher wird, und daß das Körpergewicht zunimmt.

Es beeinflussen also die Zellsalze den Stoffwechsel in der Weise, daß bei hinreichender Nahrungszufuhr der Stickstoffgehalt des Körpers auf Kosten seines Fett- und Kohlehydratbestandes anwächst.

Mit der Vitaminwirkung hat also die Zellsalzwirkung das gemeinsam, daß beide, Vitamine und Zellsalze, die Oxydation erhöhen und den Stickstoffansatz begünstigen. Zellsalzmangel muß also den Vitamin-

mangel in bezug auf die Oxydation und den Stickstoffwechsel gleichsinnig beeinflussen, die Vitaminstörung verstärken, wie es *Tsuji* (27) bei seinem Versuche aus dem hiesigen Laboratorium voraussetzt. Daß daraus aber nicht folgt, daß die Vitaminwirkung schlechthin Zellsalzwirkung sei, geht zur Genüge aus allen denjenigen Versuchen hervor, in denen die Vitaminwirkungen bei genügendem Zellsalzgehalt der Nahrung beobachtet worden sind.

Nachdem ich nun so die Wirkung der Zellsalze in ihrer Gesamtheit auf den Stoffwechsel der organischen Substanz studiert hatte, drängte sich die Frage von selbst auf, wie weit einzelne Zellsalze Träger der genannten Wirkungen sein können. Ich habe an meinem Hunde noch die Kaliwirkung studiert, indem ich im Anschluß an die letzte Kochsalzperiode, also vom 177. bis 196. Versuchstage dem Tiere außer den 3 g Kochsalz allmählich steigende Mengen von Chlorkalium zulegte, und zwar täglich vom 177. bis 182. Tage 0,18 g, vom 183. bis 188. Tage 1,8 g, vom 189. bis 196. Tage 3,0 g KCl. Vom 197. bis 202. Versuchstage wurde dann das Kali weggelassen, und das Tier erhielt wieder nur die 3 g Kochsalz mit seiner Nahrung.

Während der Kaliperiode wurde die Stickstoffbilanz allmählich mehr und mehr positiv. In dem letzten Analysenabschnitt der voraufgehenden Kochsalzperiode betrug sie + 0,15 g, am Ende der Kaliperiode hatte sie den Wert von + 0,57 g pro Tag erreicht. Das Körpergewicht stieg in dieser Zeit von 8270 auf 8470 g an; die durchschnittliche tägliche Harnmenge betrug 454 ccm, war also fast genau so groß wie in der voraufgegangenen Kochsalzperiode (420 ccm) und der dieser vorangegangenen Zellsalzperiode (549 ccm). Der am Ende der Kaliperiode am 196. Versuchstage aufgezeichnete Gaswechsel ergab wieder einen erhöhten Wert gegenüber der letzten Kochsalzperiode.

Vom 198. bis 202. Versuchstage erhielt der Hund abermals mit der Nahrung lediglich 3 g Kochsalz. Die Stickstoffbilanz, die am Ende der Kaliperiode + 0,5723 betragen hatte, sank sofort auf + 0,46 g; das Körpergewicht nahm in diesen 6 Tagen um 170 g ab. Nun wurde der Versuch abgebrochen. *Es hatte sich also gezeigt, daß auch eine vermehrte Kalizulage allein genügt, um im Prinzip dieselben Phänomene an dem Stoffwechsel dieses Tieres hervorzurufen, die die Gesamtsumme der Zellsalze ausgelöst hatten.* Es wird die Aufgabe weiterer Forschung sein, zu ermitteln, wie weit durch die einzelnen anderen Komponenten meines Zellsalzgemisches gleiche Wirkungen erzielt werden.

Zusammenfassung.

In einem über 202 Tage sich erstreckenden Stoffwechselversuche am Hunde wird gezeigt, daß Zulage eines Zellsalzgemisches zu einer an Zellsalz sehr armen Grundnahrung, die aber eine bestimmte Koch-

salzmenge, einen bestimmten, hinreichenden Wassergehalt und einen genügenden Vitaminvorrat an den Faktoren A, B, C und D enthält, eine Steigerung der Oxydation und eine Stickstoffretention bewirkt, ohne daß irgendwie erheblichere Änderungen in der Wasserausscheidung durch den Harn und Kot dabei auftreten, und daß die gleichen Erscheinungen auch durch die Zulage eines Kalisalzes (KCl) zu der kochsalzhaltigen Grundnahrung hervorgerufen werden können. Aus alledem geht hervor, daß die Zellsalzwirkung auf den Stoffwechsel der organischen Substanz in gewissem Umfange gleichsinnig mit den entsprechenden Vitaminwirkungen verläuft. Eine Identität der Vitamine mit den Zellsalzen kann daraus natürlich nicht gefolgert werden und wird auch nicht behauptet.

Diese Beobachtungen über den Einfluß der Zellsalze und speziell des Kaliums auf die Körpergewichtszunahme beim Tiere gewinnen aber eine besondere Bedeutung, wenn man sich an folgende Tatsachen der Pflanzenphysiologie [*Pfeffer* (26)] erinnert.

Kalimangel ruft bei einer Wasserkultur von Buchweizen eine ganz enorme Wachstumshemmung hervor, auch wenn die Nährlösung alle anderen für das normale Gedeihen der Pflanze erforderlichen Stoffe enthält. In ähnlicher Weise wirkt bei Pflanzen der Phosphormangel und auch der Eisenmangel hemmend auf das Wachstum. Zu der Wachstumshemmung durch Eisenmangel tritt noch eine besondere Hemmung in der Chlorophyllbildung, obgleich das Chlorophyll als solches Eisen nicht enthält. Diese Beobachtung ist ein anschauliches Beispiel für das, was ich oben sagte, daß nämlich die bei dem Mangel eines bestimmten Minerals in Erscheinung tretende Störung eine indirekte Folge sein kann und nicht notwendig darauf zu beruhen braucht, daß das betreffende Mineral an dem Aufbau des bei seiner Abwesenheit ausfallenden Phänomens im normalen Körper direkt beteiligt ist.

Endlich unterhält bei der Pflanze das Kalium auch innigere Beziehungen zum Kohlehydratstoffwechsel. Das geht daraus hervor, daß bei Kalimangel die Stärke aus den beleuchteten Blättern schwindet, was eben eine der vielen Folgen des herbeigeführten pathologischen Zustandes ist.

So sehen wir, wie das Kalium in dem Stoffwechsel des pflanzlichen und tierischen Körpers eine ähnliche Rolle spielt.

Eine Reihe von neuen Fragestellungen ergibt sich aus meiner vorliegenden Untersuchung und aus dem Vergleich ihrer Ergebnisse mit den Erfahrungen der Pflanzenphysiologie.

Herr Prof. *Bickel*, auf dessen Anregung ich die vorliegende Arbeit ausführte, behält sich vor, diese Fragen weiter in seinem Laboratorium bearbeiten zu lassen.

Tabelle des Verlaufes der Untersuchung.

Nummer des Versuchstages	Körpergewicht	Tägliche Harnmenge	Durchschnittliche Harnmenge	Gesamt-N im Harn	Durchschnittl. N-Ausscheidung im Harn	Kotmenge frisch	Kotmenge getrocknet	Kotmenge Wassergehalt des Kotes	Kot-N	Gesamte N-Ausscheidung im Harn und Kot	Nahrungs-N	Tägliche N-Bilanz	Gaswechsel O₂-Verbrauch pro kg. Minute	Gaswechsel R.-Q.	Bemerkungen
1. (22. VII.)	10,020	540	—	6,3202	—	—	—	—	—	—	—	—			Grundnahrung + 30 g Citronensaft + 3 g Kochsalz
2.	9,890	950	—	7,3181	—	—	—	—	—	—	—	—			
3.	9,920	550	—	4,3035	—	—	—	—	—	—	—	—			
4.	9,950	550	—	6,1123	—	—	—	—	—	—	—	—			
5.	9,800	600	—	5,9044	—	—	—	—	—	—	—	—			
6.	9,850	630	—	6,2370	—	—	—	—	—	—	—	—			
7. (28. VII.)	9,870	700	—	6,2370	6,0618	—	52,60	—	0,3598	6,4216	6,4019	— 0,0197	6,53	0,7318	
8.	9,700	600	—	6,4691	—	—	—	—	—	—	—	—			
9.	9,550	740	—	6,5968	—	—	—	—	—	—	—	—			
10.	9,670	600	—	5,9158	—	—	—	—	—	—	—	—			
11.	9,540	600	—	4,4688	—	—	—	—	—	—	—	—			
12.	9,540	550	—	4,9795	—	—	—	—	—	—	—	—			
13.	9,560	600	—	5,3200	—	—	—	—	—	—	—	—			
14.	9,560	750	—	5,6605	5,6301	—	46,00	—	0,2623	5,8924	6,4019	+ 0,5095			
15.	9,480	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—			
16.	9,500	350	—	4,8884	—	—	—	—	—	—	—	—			
17.	9,520	750	—	5,6238	—	—	—	—	—	—	—	—			
18.	9,550	660	—	6,2727	—	—	—	—	—	—	—	—			
19.	9,480	500	—	5,1047	—	—	—	—	—	—	—	—			
20.	9,400	900	—	7,1379	—	—	—	—	—	—	—	—			
21.	9,440	600	—	5,4075	5,7392	—	37,70	—	0,2175	5,9567	6,4019	+ 0,4562			
22.	9,370	870	—	5,0554	—	—	—	—	—	—	—	—			
23.	9,270	750	—	7,3413	—	—	—	—	—	—	—	—			
24.	9,340	690	—	5,0994	—	—	—	—	—	—	—	—			
25. (15. VIII.)	9,350	550	—	6,0225	—	—	—	—	—	—	—	—	5,25	0,7100	
26.	9,260	550	—	4,9675	—	—	—	—	—	—	—	—			
27.	9,270	550	—	6,0665	—	—	—	—	—	—	—	—			
28.	9,200	650	—	6,3742	5,8467	—	41,35	—	0,2334	6,0801	6,4019	+ 0,3218			
29.	9,220	505	—	4,6945	—	—	—	—	—	—	—	—			

[illegible]	[illegible]	[illegible]	—	[illegible]	—	—	—	—	—	—	—	—		
35.	9,190	600	—	5,8265	5,7061	—	48,10	—	0,2668	5,9729	6,4019	+ 0,4290		
36.	9,140	700	—	6,1992	—	—	—	—	—	—	—	—		
37.	9,100	650	—	5,5104	—	—	—	—	—	—	—	—		
38.	9,110	600	—	5,7410	—	—	—	—	—	—	—	—		
39.	9,100	550	—	5,5104	—	—	—	—	—	—	—	—		
40.	9,120	750	—	6,4288	—	—	—	—	—	—	—	—		
41.	9,140	450	—	4,6379	—	—	—	—	—	—	—	—		
42.	9,020	650	—	5,6482	5,6680	—	47,90	—	0,2667	5,9347	6,4019	+ 0,4672		
43.	9,050	700	—	5,9690	—	—	—	—	—	—	—	—		
44.	9,050	670	—	6,0137	—	—	—	—	—	—	—	—		
45.	9,050	600	—	4,9742	—	—	—	—	—	—	—	—		
46.	9,000	700	—	5,6525	—	—	—	—	—	—	—	—		
47.	9,000	650	—	5,2003	—	—	—	—	—	—	—	—		
48.	8,920	550	—	5,0646	—	—	—	—	—	—	—	—		
49.	8,920	850	—	6,6021	5,6395	—	42,80	—	0,2466	5,8862	6,4019	+ 0,5158		
50.	8,920	600	—	5,3291	—	—	—	—	—	—	—	—		
51.	8,950	750	—	6,0242	—	—	—	—	—	—	—	—		
52.	8,950	650	—	5,3291	—	—	—	—	—	—	—	—		
53.	8,900	900	—	6,2559	—	—	—	—	—	—	—	—		
54.	8,890	650	—	5,9315	—	—	—	—	—	—	—	—		
55.	8,900	500	—	4,6340	—	—	—	—	—	—	—	—		
56.	8,850	800	—	6,9510	5,7793	—	42,40	—	0,2478	6,0271	6,4019	+ 0,3748		
57.	8,900	750	—	6,6528	—	—	—	—	—	—	—	—		
58.	8,800	600	—	6,6528	—	—	—	—	—	—	—	—		
59. (18. IX.)	8,820	600	—	5,9136	—	—	—	—	—	—	—	—	6,06	0,6820
60.	8,750	650	—	6,1600	—	—	—	—	—	—	—	—		
61.	8,720	650	—	6,1600	—	—	—	—	—	—	—	—		
62.	8,650	650	—	5,6672	—	—	—	—	—	—	—	—		
63.	8,700	550	—	5,4701	6,0966	—	49,70	—	0,3807	6,4773	6,4019	— 0,0754		
64.	8,670	500	—	6,3756	—	—	—	—	—	—	—	—		
65.	8,650	600	—	6,0858	—	—	—	—	—	—	—	—		
66.	8,650	500	—	6,3756	—	—	—	—	—	—	—	—		
67.	8,620	600	—	6,3756	—	—	—	—	—	—	—	—		
68.	8,600	600	—	6,3756	—	—	—	—	—	—	—	—		
69.	8,550	500	—	6,3756	—	—	—	—	—	—	—	—		
70.	8,580	500	—	5,7960	6,2514	—	59,20	—	0,4525	6,7039	6,4019	— 0,3020		

Tabelle des Verlaufes der Untersuchung (Fortsetzung).

Nummer des Versuchstages	Körpergewicht	Tägliche Harnmenge	Durchschnittliche Harnmenge	Gesamt-N im Harn	Durchschnittl. N-Ausscheidung im Harn	Kotmenge frisch	Kotmenge getrocknet	Kotmenge Wassergehalt des Kotes	Kot-N	Gesamte N-Ausscheidung im Harn und Kot	Nahrungs-N	Tägliche N-Bilanz	Gaswechsel O_2-Verbrauch pro kg. Minute	Gaswechsel R. Q.	Bemerkungen
71.	8,520	650	—	6,2100	—	—	—	—	—	—	—	—			
72.	8,500	500	—	6,7500	—	—	—	—	—	—	—	—			
73.	8,500	500	—	5,6700	—	—	—	—	—	—	—	—			
74.	8,500	500	—	5,9400	—	—	—	—	—	—	—	—			
75.	8,470	550	—	5,9400	—	—	—	—	—	—	—	—			
76.	8,450	800	—	7,0200	—	—	—	—	—	—	—	—			
77.	8,450	500	—	5,6700	6,1714	—	63,90	—	0,5495	6,7209	6,4019	— 0,3190			Grundnahrung + 60 g Citronensaft + 3 g Kochsalz
	Hauptperiode														
78. (7. X.)	8,450	755	—	7,1659	—	—	—	—	—	—	—	—			
79.	8,450	645	—	5,4362	—	—	—	—	—	—	—	—			
80.	8,450	650	—	5,9304	—	—	—	—	—	—	—	—			
81.	8,420	655	—	5,4362	—	—	—	—	—	—	—	—			
82.	8,400	500	—	5,9304	—	—	—	—	—	—	—	—			
83.	8,400	590	—	5,9782	—	—	—	—	—	—	—	—			
84.	8,420	605	630	5,6833	5,9375	113,00	53,05	59,95	0,4011	6,3386	6,4120	+ 0,0735			
85.	8,400	574	—	5,8058	—	—	—	—	—	—	—	—			
86.	8,350	420	—	5,5419	—	—	—	—	—	—	—	—			
87.	8,400	553	—	5,5419	—	—	—	—	—	—	—	—			
88.	8,450	550	—	5,5419	—	—	—	—	—	—	—	—			
89.	8,450	504	—	5,2780	—	—	—	—	—	—	—	—			
90.	8,450	652	541	5,8058	5,5858	100,00	53,20	46,80	0,4912	6,0771	6,4120	+ 0,3349			
91.	8,420	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—			
92.	8,370	565	—	5,8359	—	—	—	—	—	—	—	—			
93.	8,400	550	—	5,5580	—	—	—	—	—	—	—	—			
94.	8,400	525	—	5,5580	—	—	—	—	—	—	—	—			
95.	8,400	450	—	5,5580	—	—	—	—	—	—	—	—			
96.	8,450	550	—	6,1138	—	—	—	—	—	—	—	—	7,06	0,7297	
97. (26. X.)	8,450	394	—	[illegible]	—	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]			

102.	8,500	500	—	5,3802	—	—	—	—	—	—	—	—			
103.	8,470	564	—	5,1240	—	—	—	—	—	—	—	—			
104.	8,500	535	517	5,3802	5,5510	163,00	59,50	103,50	0,5430	6,0940	6,4120	+ 0,3181			
105.	8,470	550	—	5,7036	—	—	—	—	—	—	—	—			Grundnahrung + 60 g Zitronensaft + 3 g Kochsalz + 3 g Zellsalz
106.	8,450	575	—	5,9752	—	—	—	—	—	—	—	—			
107.	8,400	550	—	5,4320	—	—	—	—	—	—	—	—			
108.	8,420	525	—	5,9752	—	—	—	—	—	—	—	—			
109.	8,450	505	—	5,7036	—	—	—	—	—	—	—	—			
110.	8,550	545	541	5,4320	5,7036	146,00	65,60	80,40	0,5719	6,2755	6,4120	+ 0,1365			
111.	8,450	410	—	5,3480	—	—	—	—	—	—	—	—			
112.	8,400	455	—	5,6154	—	—	—	—	—	—	—	—			
113.	8,520	420	—	5,3480	—	—	—	—	—	—	—	—			
114.	8,500	555	—	5,8828	—	—	—	—	—	—	—	—			
115.	8,470	560	—	5,8828	—	—	—	—	—	—	—	—			
116.	8,450	400	466	5,3480	5,5708	107,00	37,40	69,60	0,2998	5,8706	6,4120	+ 0,5414			
117.	8,500	450	—	6,0536	—	—	—	—	—	—	—	—			
118.	8,500	470	—	6,3168	—	—	—	—	—	—	—	—			
119.	8,500	455	—	5,7904	—	—	—	—	—	—	—	—			
120.	8,550	395	—	5,2640	—	—	—	—	—	—	—	—			
121.	8,550	482	—	5,5272	—	—	—	—	—	—	—	—			
122.	8,600	448	450	5,2640	5,7027	98,00	19,10	78,90	0,1371	5,8398	6,4120	+ 0,5722			
123.	8,600	450	—	5,1520	—	—	—	—	—	—	—	—			
124.	8,600	445	—	5,6672	—	—	—	—	—	—	—	—			
125.	8,590	455	—	5,1520	—	—	—	—	—	—	—	—			
126.	8,590	457	—	5,5126	—	—	—	—	—	—	—	—			
127.	8,600	490	—	5,9248	—	—	—	—	—	—	—	—			
128. (29. XI.)	8,610	502	466	5,4096	5,4697	114,00	27,90	86,10	0,2044	5,6741	6,4120	+ 0,7379	7,79	0,7391	
129.	8,600	410	—	4,7600	—	—	—	—	—	—	—	—			
130.	8,600	390	—	4,7600	—	—	—	—	—	—	—	—			
131.	8,670	450	—	4,7600	—	—	—	—	—	—	—	—			
132.	8,670	445	—	4,9980	—	—	—	—	—	—	—	—			
133.	8,800	365	—	4,2840	—	—	—	—	—	—	—	—			
134.	8,800	540	433	5,7120	4,8790	83,00	32,00	51,00	0,2342	5,1132	6,4120	+ 1,2988			

Tabelle des Verlaufes der Untersuchung (Fortsetzung).

Nummer des Versuchstages	Körpergewicht	Tägliche Harnmenge	Durchschnittliche Harnmenge	Gesamt-N im Harn	Durchschnittl. N-Ausscheidung im Harn	Kotmenge frisch	Kotmenge getrocknet	Kotmenge Wassergehalt des Kotes	Kot-N	Gesamte N-Ausscheidung im Harn und Kot	Nahrungs-N	Tägliche N-Bilanz	Gaswechsel O_2-Verbrauch pro kg. Minute	Gaswechsel R.-Q.	Bemerkungen
135.	8,750	500	—	5,3900	—	—	—	—	—	—	—	—			
136.	8,800	400	—	4,9000	—	—	—	—	—	—	—	—			
137.	8,820	400	—	4,9000	—	—	—	—	—	—	—	—			
138.	8,800	410	—	4,9000	—	—	—	—	—	—	—	—			
139.	8,810	395	—	4,9000	—	—	—	—	—	—	—	—			
140.	8,820	495	433	4,9000	4,9816	83,00	39,80	43,20	0,2974	5,2790	6,4120	+1,1330			
141.	8,830	500	—	5,1597	—	—	—	—	—	—	—	—			
142.	8,820	410	—	4,9140	—	—	—	—	—	—	—	—			
143.	8,840	395	—	4,9140	—	—	—	—	—	—	—	—			
144.	8,860	400	—	4,9140	—	—	—	—	—	—	—	—			
145.	8,870	425	—	4,9140	—	—	—	—	—	—	—	—			
146.	8,900	420	425	4,9140	4,9549	110,00	30,10	79,90	0,2380	5,1929	6,4120	+1,2191			Grundnahrung + 60 g Citronensaft + 3 g Kochsalz
147.	8,900	400	—	5,0960	—	—	—	—	—	—	—	—			
148.	8,870	450	—	5,3508	—	—	—	—	—	—	—	—			
149.	8,870	475	—	5,3508	—	—	—	—	—	—	—	—			
150.	8,860	425	—	5,4018	—	—	—	—	—	—	—	—			
151.	8,860	470	—	5,6056	—	—	—	—	—	—	—	—			
152.	8,870	530	458	5,6056	5,4018	72,00	30,65	41,35	0,3030	5,7048	6,4120	+0,7072			
153.	8,870	450	—	6,3140	—	—	—	—	—	—	—	—			
154.	8,820	470	—	5,8835	—	—	—	—	—	—	—	—			
155.	8,820	400	—	5,7400	—	—	—	—	—	—	—	—			
156.	8,820	450	—	6,3140	—	—	—	—	—	—	—	—			
157.	8,670	490	—	5,1086	—	—	—	—	—	—	—	—			
158.	8,670	330	432	3,9032	5,5439	78,00	50,60	27,40	0,3011	5,8450	6,4120	+0,5670			
159.	8,770	340	—	4,9469	—	—	—	—	—	—	—	—			
160.	8,670	550	—	6,2171	—	—	—	—	—	—	—	—			
161.	8,640	590	—	6,9524	—	—	—	—	—	—	—	—			
162.	8,660	320	—	5,0806	—	—	—	—	—	—	—	—			
163.	[illegible]	[illegible]	—	[illegible]	—	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]			

168.	8,470	390	—	5,8968	—	—	—	—	—	—	—	—			
169.	8,450	415	—	5,5188	—	—	—	—	—	—	—	—			
170.	8,350	300	366	7,5600	5,7080	115,00	49,31	65,69	0,3463	6,0543	6,4120	+0,3577			
171.	8,350	200	—	4,4968	—	—	—	—	—	—	—	—			
172.	8,300	400	—	5,8821	—	—	—	—	—	—	—	—			
173.	8,300	450	—	6,1831	—	—	—	—	—	—	—	—			
174.	8,320	500	—	5,8821	—	—	—	—	—	—	—	—			
175.	8,300	500	—	6,1831	—	—	—	—	—	—	—	—			
176. (16. I.)	8,270	450	417	5,6210	5,9959	88,00	37,70	50,30	0,2657	6,2616	6,4120	+0,1504	7,05	0,6710	
177.	8,270	450	—	5,7257	—	—	—	—	—	—	—	—			Grundnahrung + 60 g Citronensaft + 3 g Kochsalz + 0,18 g K Cl
178.	8,250	400	—	5,4530	—	—	—	—	—	—	—	—			
179.	8,270	500	—	5,4530	—	—	—	—	—	—	—	—			
180.	8,300	500	—	5,7802	—	—	—	—	—	—	—	—			
181.	8,280	425	—	5,4530	—	—	—	—	—	—	—	—			
182.	8,300	400	446	5,4530	5,5530	80,00	22,20	57,80	0,4231	5,9761	6,4120	+0,4359			
183.	8,300	600	—	6,3928	—	—	—	—	—	—	—	—			Grundnahrung + 60 g Citronensaft + 3 g Kochsalz + 1,8 g K Cl
184.	8,200	400	—	5,3699	—	—	—	—	—	—	—	—			
185.	8,320	550	—	5,6256	—	—	—	—	—	—	—	—			
186.	8,330	400	—	6,2165	—	—	—	—	—	—	—	—			
187.	8,310	450	—	5,1142	—	—	—	—	—	—	—	—			
188.	8,410	350	458	5,1142	5,4722	65,00	27,46	37,54	0,2693	5,7415	6,4120	+0,6705			
189.	8,460	250	—	4,5815	—	—	—	—	—	—	—	—			Grundnahrung + 60 g Citronensaft + 3 g Kochsalz + 3 g K Cl
190.	8,480	375	—	5,3900	—	—	—	—	—	—	—	—			
191.	8,400	520	—	5,4439	—	—	—	—	—	—	—	—			
192.	8,400	600	—	6,4680	—	—	—	—	—	—	—	—			
193.	8,450	450	—	6,3063	—	—	—	—	—	—	—	—			
194.	8,470	630	—	6,6297	—	—	—	—	—	—	—	—			
195.	8,460	415	—	5,3900	—	—	—	—	—	—	—	—			
196. (5. II.)	8,470	410	456	5,4978	5,7134	36,00	19,02	16,98	0,1263	5,8395	6,4120	+0,5723	8,06 (?)	0,805 (?)	
197.	8,470	300	—	6,0200	—	—	—	—	—	—	—	—			Grundnahrung + 60 g Citronensaft + 3 g Kochsalz
198.	8,450	250	—	4,8160	—	—	—	—	—	—	—	—			
199.	8,400	350	—	5,7190	—	—	—	—	—	—	—	—			
200.	8,500	510	—	6,3812	—	—	—	—	—	—	—	—			
201.	8,400	430	—	6,0200	—	—	—	—	—	—	—	—			
202. (11. II.)	8,300	300	356	5,4180	5,7290	42,00	29,18	12,82	0,2197	5,9488	6,4120	+0,4633			

Versuchsprotokoll.

Der Stickstoff wurde nach *Kjeldahl* bestimmt, der Kot wurde durch Carmin abgegrenzt. Der Gaswechsel wurde nach Anlegung einer Trachealkanüle nach der Methode von *Zuntz-Geppert* bestimmt.

Der N-Gehalt der Nahrung setzte sich wie folgt zusammen:

40 g Weizeneiweiß	5,6640 g N
60 g Reis	0,7278 g N
30 ccm Citronensaft.	0,0101 g N
(60 „ „	0,0202 g N)
35 g Butter	—
750 ccm Aqua destillata	—
Summa . .	6,4019 g N
	(6,4120 g N)

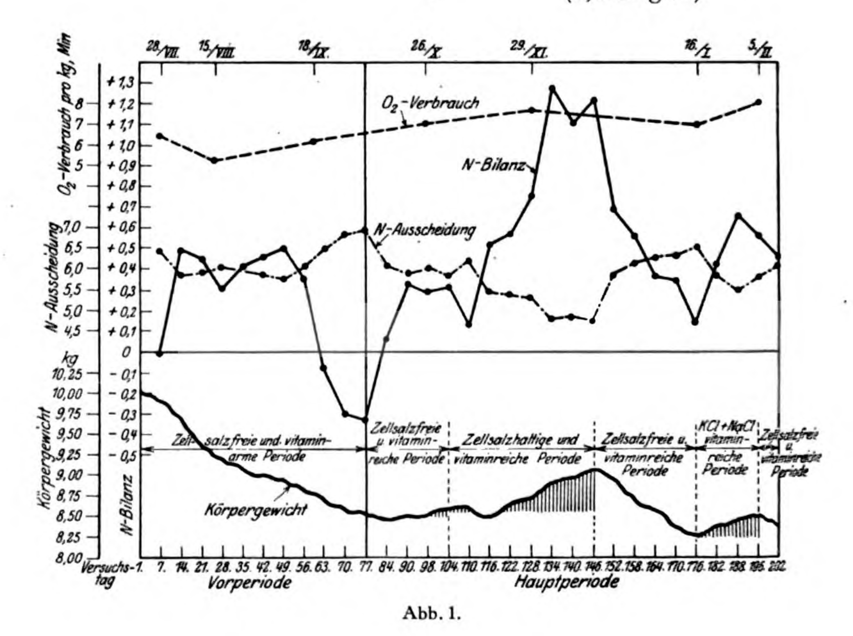


Abb. 1.

Literatur.

1) *Albu* und *Neuberg*, Physiologie und Pathologie des Mineralstoffwechsels. Berlin 1906. — 2) Zitiert nach 1. — 3) *Carl Voit*, Über den Einfluß des Kochsalzes auf den Stoffwechsel. München 1860. — 4) *Straub*, Zeitschr. f. Biol. **37**, **38**, 1899. — 5) *Rost*, Arbeiten aus dem Kaiserl. Gesundheitsamt Berlin **18**, 1901. — 6) *Gruber*, Verhandl. d. 71. Naturforscherversammlung in München 1899. — 7) *Belli*, Zeitschr. f. Biol. **45**, 1904 (ausführliche Literaturangaben daselbst). — 8) *Starkenstein*, diese Zeitschr. **106**. — 9) *Miyadera*, Zeitschr. f. physik. u. diät. Therapie 1921. — 10) *Kaplan*, Veröffentl. d. Zentralstelle f. Balneol. **1**, Heft 8. — 11) *Hirsch* und *Aufrecht*, Zeitschr. f. physik. u. diät. Therapie 1905. — 12) *Mustafa Kemal*, ebendaselbst 1920. — 13) *Bickel* und *Kemal*, Berl. klin. Wochenschr. 1920. —

14) *Zuntz, Mäder, Misch, Bing*, Zeitschr. f. Balneol. 1913, Nr. 12 und 13. — 15) *Arnoldi*, Zeitschr. f. klin. Med. **94**, 1922. — 16) *Arnoldi* und *Roubitschek*, Deutsch. med. Wochenschr. 1922, Nr. 8; Münch. med. Wochenschr. 1923, Nr. 22. — 17) *Arnoldi* und *Ettinger*, Klin. Wochenschr. 1922, Nr. 42. — 18) *Paul Mayer*, Deutsch. med. Wochenschr., Jahrg. 48, Nr. 25, 1922. — 19) *Lorant*, Klin. Wochenschr. 1922, Nr. 43. — 20) *Rubner* und *Rost*, Arbeiten des Kaiserl. Gesundheitsamtes Berlin **19**, 1902. — 21) *A. Loewy*, Arch. f. Anat. u. Physiol., physiol. Abt., **378**, 1903. — 22) *Jacques Loeb*, Die Naturwissenschaften, Heft 12, 23. März 1923. — 23) *Höber*, Verhandl. d. Gesellsch. deutsch. Naturforscher u. Ärzte, 87. Vers. 1922. Leipzig, Verlag Vogel, 1923. — 24) *Köppen*, Physikalische Chemie in der Medizin. Wien 1900. — 25) *Spiro*, Verhandl. d. Gesellsch. deutsch. Naturforscher u. Ärzte, 87. Vers. 1922. — 26) *Pfeffer*, Pflanzenphysiologie 1, Leipzig 1897. — 27) *Tsuji*, diese Zeitschr. **129**.

Über die carboxylatische Spaltung der Brenztraubensäure im Sauerstoffstrom.

Von

A. Gottschalk.

(Aus dem Kaiser Wilhelm-Institut für experimentelle Therapie und Biochemie in Berlin-Dahlem.)

(Eingegangen am 17. Juni 1923.)

Die Hefe gehört zu den fakultativ anaeroben Organismen; sie kann sowohl bei Luftabschluß als in Gegenwart von Sauerstoff leben. Gerade bei der Hefezüchtung wird eine Durchlüftung der Maischen angewendet, und es ist bekannt, daß auch unter diesen Bedingungen der Hefefabrikation eine beträchtliche alkoholische Gärung stattfindet. Da naturgemäß ein Teil des Zuckers zum Aufbau von Körpersubstanz des Hefepilzes dient, so ist die Menge des gewonnenen Sprits geringer als unter den Verhältnissen des anaeroben Gärungsversuches, bei dem keine oder nur mäßige Zellvermehrung stattfindet. Wir betrachten heute die Carboxylase als ein Teilferment der Zymase, und mit dieser Auffassung steht es im Einklange, daß nach mannigfachen vorliegenden Erfahrungen das Hauptsubstrat der Carboxylase, die Brenztraubensäure, den Zucker in ernährungsphysiologischer und energetischer Beziehung weitgehend zu ersetzen vermag; denn aller Wahrscheinlichkeit nach dienen dieselben Stoffe, die beim Zuckerabbau auftreten, auch synthetischen Zwecken. Dies darf man besonders annehmen, seitdem durch *Neuberg* und seine Mitarbeiter das Kohlenstoffketten aufbauende Ferment, die Carboligase, bekannt geworden ist[1]).

So wenig sich nun die alkoholische Gärung im Lüftungsprozeß gänzlich unterdrücken läßt, ebensowenig kann man die Carboxylasewirkung bei Sauerstoffzufuhr vollkommen unterbinden. Vor einiger Zeit hat *F. Lieben*[2]) mitgeteilt, daß brenztraubensaures Natrium beim Zusammenbringen mit Hefe im Sauerstoffstrom zerstört werde, ohne

---

[1]) *C. Neuberg* und Mitarbeiter, diese Zeitschr. **115**, **121**, **127**, **128**.

[2]) *F. Lieben*, ebendaselbst **135**, 240.

daß Acetaldehyd oder höchstens Spuren davon entständen. Nun sind die Vorgänge bei Verwendung von brenztraubensauren Alkalien wesentlich anders und viel schwerer zu überblicken als bei der Vergärung von freier Brenztraubensäure, die durch ihren außerordentlich sauren Charakter ($K = 5{,}6 \times 10^{-1}$) ausgezeichnet ist; denn bei der Vergärung oder bei einer Verbrennung des brenztraubensauren Natriums entsteht kohlensaures Alkali, und gerade schwache Alkalien befördern nach Befunden von *Th. Bokorny*[1]) die Assimilation im Verhältnis zur Gärung. Für freie Brenztraubensäure wäre es schwer vorstellbar, daß die bekanntlich sehr intensive Wirkung der Carboxylase gänzlich verdeckt werden sollte, sobald Ferment und Substrat bei Gegenwart von Sauerstoff zusammentreffen; denn die carboxylatische Zerlegung der Brenztraubensäure in Acetaldehyd und Kohlensäure ist ein glatter Zerfall, eine einfache Decarboxylierung. Hinzu kommt, daß der einmal gebildete Acetaldehyd gegen Sauerstoff unter den gewählten Bedingungen zweifellos praktisch beständig ist.

Daß tatsächlich bei Ablauf der Vergärung von freier Brenztraubensäure im Sauerstoffstrom Acetaldehyd reichlich gebildet wird, ergibt sich aus den im nachstehenden beschriebenen Experimenten.

Die Versuchsanordnung war so, daß eine Lösung von freier Brenztraubensäure mit Hefe im Sauerstoffstrom geschüttelt bzw. von diesem durchperlt wurde. Der Sauerstoff wurde einer Bombe entnommen und mit Permanganatlösung gewaschen. Die aus dem Gärgefäß austretenden Gase strichen durch eine Batterie von Vorlagen, welche eine methylalkoholische Dimedonlösung enthielten. In einigen Fällen wurde auch zur Absorption entstandenen Acetaldehyds Bisulfitlösung verwendet, und zwar in solchen Mengen, daß nach Beendigung des Versuches noch ein Überschuß an $NaHSO_3$ vorhanden und jedenfalls keine vollständige Oxydation zu Sulfat eingetreten war.

Aus den auszugsweise wiedergegebenen Versuchsprotokollen geht hervor, daß die Carboxylase im Sauerstoffstrom wirksam ist, und daß sie aus einer bestimmten Menge Brenztraubensäure zum mindesten ebensoviel Acetaldehyd in Freiheit setzt wie unter den gewöhnlichen Bedingungen. Daß in manchen Fällen sogar mehr Acetaldehyd gebildet wird, führe ich auf eine schnellere Eliminierung des Acetaldehyds aus dem Gärgute zurück, wodurch sekundäre Umwandlungen unterbleiben. Die Versuche wurden ausgeführt mit frischer obergäriger Hefe (Rasse XII), mit untergäriger Bierhefe (Patzenhofer) sowie mit Trockenhefe, die aus der angeführten Unterhefe bereitet war. Alle Hefen und Hefenpräparate besaßen gute Gärkraft.

---

[1]) *Th. Bokorny*, Chem. Zentralbl. **1917**. II. 23.

a) 20,0 ccm m-Brenztraubensäure wurden mit 180 ccm Wasser und 44 g Trockenhefe (Patzenhofer) in einem Kolben zusammengebracht und gut durchgeschüttelt. Nach Verschluß des Gefäßes mittels Wattebausches wurde das Gemisch in einen Blechkasten gestellt, dessen Temperatur auf 26° C gehalten wurde.

b) 20,0 ccm n-Brenztraubensäure wurden mit 180 ccm Wasser und 44 g Trockenhefe (Patzenhofer) zusammengebracht, gut durchgeschüttelt und in eine Schüttelente gefüllt. In das eine Ende der Schüttelente wurde Sauerstoff eingeleitet, das andere Ende war mit zwei Vorlagen verbunden, deren jede 50 ccm einer 20 proz. Bisulfitlösung enthielt. Die Schüttelente befand sich in dem gleichen auf 26° C erwärmten Behälter.

Zu a). Nach 48stündigem Stehen wurde filtriert und das Filtrat mit 10 g Calciumcarbonat in der an anderem Orte beschriebenen Weise[1]) destilliert. Destillat = 610 ccm. Bei der Titration wurden in 50 ccm Destillat 0,0199 g Acetaldehyd gefunden. Dann sind in 610 ccm Destillat 0,2435 g Acetaldehyd oder 27,67 Proz. der Menge, die aus der bei Versuchsbeginn vorhandenen Brenztraubensäure entstehen kann.

Zu b). Nach 48stündiger Sauerstoffdurchlüftung, während welcher 14 Stunden lang geschüttelt war, wurde der Inhalt der Ente und der beiden Vorlagen quantitativ in ein Gefäß übergeführt, mit Soda und Chlorbarium versetzt und filtriert. Von den 430 ccm Filtrat wurden 200 ccm mittels 10 g Calciumcarbonat in üblicher Weise destilliert. Destillat = 320 ccm. Bei der Titration wurden in 50 ccm Destillat 0,0214 g, also in 320 ccm Destillat 0,1369 g Acetaldehyd gefunden. Im Sauerstoffstrom geschüttelte Hefe vermochte demnach 33,47 Proz. der theoretisch möglichen Menge Aldehyd aus der angewendeten Brenztraubensäure zu erzeugen.

c) Um festzustellen, ob der in der Sulfitvorlage gebundene Acetaldehyd von dem dauernd hindurchstreichenden Sauerstoff angegriffen wird, wurde folgender Kontrollversuch vorgenommen.

Von einer Aldehydlösung, die in 20,0 ccm Wasser rund 2,0 g Acetaldehyd enthielt, wurden 2,0 ccm in eine Vorlage mit 50 ccm 10 proz. Kaliumbisulfitlösung eingefüllt. Hinter dieser Vorlage befand sich eine zweite mit ebenfalls 50 ccm 10 proz. Bisulfitlösung (ohne Aldehyd). Durch beide Vorlagen wurde 44 Stunden lang ein Strom von Sauerstoff hindurchgeleitet. Durch Titration wurden in 0,5 ccm der eingefüllten Aldehydlösung am Anfang des Versuches 0,0474 g Acetaldehyd gefunden; es waren also zu Versuchsbeginn in der Bisulfitvorlage insgesamt 0,1896 g Acetaldehyd vorhanden.

---

[1]) *Neuberg* und *Reinfurth*, diese Zeitschr. 89, 365 1918; Ber. 53, 1039, 1920.

Nach 44 Stunden wurde der Inhalt der beiden Sulfitvorlagen quantitativ in eine große Flasche gespült, mit Sodalösung unter Kühlung neutralisiert und mit 50 ccm m-$BaCl_2$-Lösung versetzt. Der Inhalt des Gefäßes wurde mittels 10 g Calciumcarbonat destilliert und das Destillat (gleich 220 ccm) auf Aldehyd analysiert. Es waren in 50 ccm Destillat 0,0423 g Acetaldehyd, in 220 ccm Destillat, d. h. im vorgelegten Sulfit bei Versuchsende, 0,1861 g Acetaldehyd enthalten. Damit ist erwiesen, daß die Acetaldehyd-Sulfit-Verbindung gegen Sauerstoff nahezu vollkommen beständig ist.

d) 20,0 ccm m-Brenztraubensäurelösung wurden mit 180 ccm Wasser und 44 g Oberhefe XII in eine Flasche gebracht; das gut umgeschüttelte Gemisch wurde in einen Brutschrank von 37° C gestellt. Ein Ableitungsglasrohr führte aus der Flasche mit dem Gärgut durch die Brutschrankdecke hindurch in zwei Vorlagen, in denen sich zusammen 3 g Dimedon (Dimethylhydroresorcin) und 40 ccm 50proz. Methylalkohol befanden.

e) Ansatz und Anordnung wie bei d); jedoch wurde das System dauernd mit gewaschenem Sauerstoff durchperlt.

Zu d). Nach 41 Stunden wurde das Gärgemisch über 5 g Calciumcarbonat destilliert und das Übergegangene mit dem Inhalt der beiden Vorlagen in einem Destillationskolben vereinigt. Nunmehr wurde im Vakuum bei 40° Wasserbadtemperatur bis auf einige Kubikzentimeter eingeengt. Diese wurden in wenigen Kubikzentimetern heißen Alkohols gelöst und quantitativ in einen Stutzen, der 750 ccm Wasser (die 250fache Menge des angewandten Dimedons) enthielt, eingetropft. Ich ließ den entstehenden flockigen, weißen Niederschlag sich während 24 Stunden absetzen, nutschte die darüber stehende klare Flüssigkeit ab, wusch nach und trocknete den Niederschlag im Exsikkator. Nach 58 Stunden konstantes Gewicht von 1,828 g; Schmelzpunkt der Verbindung 137 bis 139°. Aus dem gefundenen Aldomedon berechnet sich eine Aldehydmenge von 0,263 g; d. h. von der Brenztraubensäure des Ausgangsgemisches waren 29,88 Proz. der theoretisch möglichen Menge fermentativ in Acetaldehyd übergeführt worden.

Zu e). Behandlung des Gärgutes und der beiden Vorlagen ebenso wie bei d). Nach 58 Stunden gleichbleibendes Gewicht von 2,1965 g, Schmelzpunkt 138 bis 139°. Hieraus berechnen sich 0,316 g Acetaldehyd. Bei Sauerstoffdurchlüftung des Gärgemisches wurden demnach 35,91 Proz. von der theoretisch möglichen Menge Acetaldehyd aus der zu Versuchsbeginn vorhandenen Brenztraubensäure gewonnen.

Zur Kontrolle wurde das aus Ansatz d) erhaltene Aldomedon auf bekannte Weise in sein Anhydrid übergeführt. Aus 1,75 g erhielt ich 1,58 g Anhydrid vom Schmelzpunkt 172 bis 173°. Die Substanz

hatte nach Absaugen, Auswaschen und Trocknen den richtigen Schmelzpunkt von 174 bis 175°.

Versuche f) und g) ebenso wie Versuche d) und e); jedoch wurde diesmal frische, gewaschene untergärige Patzenhofer Bierhefe benutzt.

f) Nach 65 Stunden wurden Gärgemisch und der Inhalt der beiden Vorlagen auf die erwähnte Art weiter verarbeitet.

Nach 60stündigem Trocknen im Exsikkator konstantes Gewicht des erhaltenen Aldomedons: 1,077 g; Schmelzpunkt 137 bis 138°; daraus ergibt sich 0,155 g Acetaldehyd, d. h. 17,61 Proz. der Theorie.

g) Nach 65stündiger Sauerstoffdurchlüftung wurden Gärgut und Vorlagen wie bei f) behandelt. Nach 60stündigem Trocknen im Exsikkator 1,708 g gewichtskonstantes Aldomedon vom Schmelzpunkt 138°; sie entsprechen 0,245 g Acetaldehyd. Es waren demnach bei Sauerstoffdurchlüftung des Gärgutes 27,84 Proz. der theoretisch erzielbaren Menge an Acetaldehyd entstanden.

Zur weiteren Kennzeichnung wurde das aus Ansatz g) erhaltene Acetaldomedon in das Anhydrid übergeführt: 1,65 g Substanz lieferten 1,45 g Aldomedonanhydrid vom Schmelzpunkt 174 bis 175°. Nach dem Umkristallisieren aus 85 proz. Alkohol schied sich das Anhydrid in weißen Blättchen aus und hatte nach Absaugen, Auswaschen und Trocknen den richtigen Schmelzpunkt von 175°.

Der Einfluß der Nebennierenbestandteile auf das Wachstum von Bakterien und deren Toxinbildung.

Von

Karl Pesch und **Kurt Strelow.**

(Aus dem hygienischen Institut der Universität Köln.)

(Eingegangen am 18. Juni 1923.)

Van Herwerden stellte fest, daß nach Zusatz ganz geringer Mengen von getrockneter Nebennierenrinde zum Kulturwasser das Wachstum von Daphnia pulex, Limnaea ovata und Froschlarven (Rana esculenta) beschleunigt und die Fortpflanzungsfähigkeit dieser Organismen gesteigert wurde.

Da sich bei den angeführten Tieren die verschiedenen Bedingungen für das Zustandekommen einer Entwicklungsförderung kaum trennen und der Einzelbeobachtung zugänglich machen lassen, hielten wir es für angezeigt, ein einfacheres Versuchsobjekt zu wählen, um die Gründe für das beobachtete Phänomen klarzustellen. Einzellige Lebewesen, und zwar Bakterien, schienen uns hierfür geeignet zu sein, da ja bei diesen wachstumshemmende oder -fördernde Einflüsse durch Keimzahlbestimmung der Kulturen sich leicht nachweisen lassen.

Zunächst wurde geprüft, ob, wie bei *van Herwerden*, ein Zusatz von 2 mg getrockneter und pulverisierter Rindernebennierenrinde zu je 5 ccm der Bouillonkulturen verschiedener Bakterienstämme deren Vermehrung begünstigt[1]).

Die Zahl der in der Kultur vorhandenen Keime wurde durch Aussaat einer Normalöse der Kulturflüssigkeit auf Agarplatten und durch Zählung der nach 24 Stunden gewachsenen Kolonien bestimmt; auf die gleiche Weise wurde die Keimzahl einer Kontrollkultur ohne Zusatz von Nebennierenrinde festgestellt.

Es ergab sich, daß der Zusatz von getrockneter Rindernebennierenrinde die erwartete Wachstumsanregung bei den geprüften

---

[1]) Über die Einzelheiten der Technik ist in der Dissertation von *Strelow* Näheres einzusehen. Selbstverständlich wurden die Nebennierenrindebouillonkulturen vor der Einsaat der zu prüfenden Stämme auf Sterilität untersucht.

Stämmen (Staphylokokken, Typhus-, Koli- und Diphtheriebakterien) nicht brachte. Auch der Zusatz *frischer* Emulsion von Rindernebennierenrinde zeigte keine Wirkung. Die Keimzahl der Nebennierenrindenkulturen war stets die gleiche wie die der Kontrollröhrchen. Auf die Wiedergabe von Tabellen, die in der Dissertation von *Strelow* ausführlich aufgenommen sind, verzichten wir an dieser Stelle aus den bekannten Gründen.

Auch das den Kulturen von Staphylokokken, Typhus- und Kolibakterien zugesetzte pulverisierte Nebennieren*mark* erwies sich als wirkungslos, wenn man von einer geringen Entwicklungshemmung während der ersten Stunden absieht. Auffallenderweise wurde jedoch *das Wachstum von Diphtheriebakterien durch Markzusatz so stark gehemmt,* daß die Bouillonkulturen vollständig klar blieben und in den späteren Aussaaten überhaupt keine Diphtheriebakterien nachzuweisen waren, gegenüber einigen Millionen Keimen in der gleichen Menge der Kontrollkulturen. Diese Wachstumshemmung trat auch bei Bacterium proteus 0 X 19 für die ersten 24 Stunden auf, vom zweiten Tage an jedoch war hier die normale Keimzahl wieder erreicht. Auch durch 10 Minuten langes Erhitzen auf 100° C wird diese Wirkung des Nebennierenmarkes auf Diphtheriebakterien nicht aufgehoben.

Da das Mark deutliche Adrenalinreaktion zeigte, könnte man diese Wachstumshemmung auf den Adrenalingehalt zurückführen. *Stutzer* hat bereits 1914 Versuche in dieser Richtung unternommen. Seine Angaben beziehen sich auf das Wachstum auf festen Nährböden mit Markzusatz, das bei gewissen Bakterien verschieden stark gehemmt wurde. Durch die genauere Zählmethode in den flüssigen Kulturen konnte also jetzt eine elektiv hemmende Wirkung des Nebennierenmarkes auf Diphtheriebakterien nachgewiesen werden. Versuche mit käuflichen Adrenalinpräparaten wurden nicht angestellt, da diesen Mitteln stets Salzsäure zugesetzt ist.

Zur Erklärung der durch *van Herwerden* beobachteten Erscheinungen ist also die Annahme einer Anregung des Wachstums im Sinne einer Zellvermehrung nicht wahrscheinlich. Es sei deshalb auf die Möglichkeit einer entgiftenden Wirkung der dem Kulturwasser zugesetzten Nebennierenrinde hingewiesen; die Begünstigung des Wachstums und die Erhöhung der Fertilität wäre so durch Beseitigung schädlicher Einflüsse — Bindung von Giftstoffen — zu erklären.

Es wurde in Tierversuchen die entgiftende Wirkung der Nebennierenrinde einer weiteren Prüfung unterzogen; es wurde versucht, eine Bindung der Toxine in statu nascendi dadurch herbeizuführen, daß statt des reinen Giftes den Versuchstieren (Meerschweinchen) eine Aufschwemmung lebender, stark giftproduzierender Diphtheriebakterien eingespritzt wurde. Gleichzeitig wurde den Tieren eine

frische Aufschwemmung von Nebennieren*rinde* oder *-mark*, das eine Mal örtlich getrennt, in anderen Versuchen an die gleiche Stelle eingespritzt.

Wir konnten bei diesen Versuchen nachweisen, daß die *gleichzeitige* und *gleichörtliche* Einspritzung von Diphtheriebakterien und Nebennierenrinde den Tod der Tiere ganz zu verhindern imstande ist, wohingegen die Injektion von Diphtheriebakterien und Nebennierenrinde an *verschiedenen* Stellen des Körpers die Toxinwirkung nur verzögert. Mit Diphtheriebakterien gleichzeitig eingespritztes Nebennieren*mark* vermag ebenfalls den Tod der Tiere hinauszuschieben, was ja nach den Ergebnissen unserer oben beschriebenen Kulturversuche auf die Wachstumshemmung der Bakterien durch das gleichzeitig eingespritzte Mark zurückgeführt werden kann. Durch unsere Beobachtungen wird die Ansicht der Pathologen bestätigt, daß die starken Veränderungen gerade der Nebennierenrinde bei gewissen Infektionskrankheiten und Intoxikationen auf eine Bindung des schädigenden Giftes durch die Rindenstoffe zurückzuführen ist.

Zusammenfassung.

Durch Kulturversuche und Tierexperimente wird es wahrscheinlich gemacht, daß die durch *van Herwerden* beobachteten Erscheinungen einer vermehrten Wachstumsintensität und erhöhten Fruchtbarkeit von Daphnien, Limnaen und Froschlarven in Kulturen mit Nebennierenrindenzusatz nicht auf eine direkte Anregung der Zellvermehrung (etwa durch vitaminartige Stoffe), sondern auf eine Bindung der in dem Kulturwasser enthaltenen giftigen Stoffe zurückzuführen ist.

Literatur.

1) *M. A. van Herwerden*, Biol. Zentralbl. 1922. — 2) *M. J. Stutzer*, Zeitschr. f. Immunitätsforschung **22**, 372, 1914. — 3) *K. Strelow*, Dissertation Köln, 1923.

Eine Methode zur Bestimmung der Gallensäuren im Duodenalsaft.

Von

Ernst Christoph Meyer.

(Aus der medizinischen Universitätsklinik Greifswald.)

(Eingegangen am 18. Juni 1923.)

Mit 2 Abbildungen im Text.

Unsere Kenntnisse über die Ausscheidungsverhältnisse der Gallensäuren unter physiologischen und pathologischen Bedingungen sind zurzeit noch sehr gering. Der Grund hierfür liegt darin, daß es bisher noch keine einwandfreie Methode der Bestimmung der Gallensäuren gab. Um diese Lücke auszufüllen, arbeitete ich eine solche Methode aus. Versuche, die Gallensäuren durch Fällung, Adsorption oder Ultrafiltration zu isolieren, erwiesen sich bald als wenig aussichtsvoll. Dagegen erschien mir eine Methode, welche sich auf der starken oberflächenaktiven Kraft der Gallensäuren aufbaut, als sehr wohl durchführbar; denn es ist ja nur nötig, die Galle so weit zu verdünnen, bis ihre Oberflächenspannung bei geringer Konzentrationsänderung deutliche Unterschiede aufweist und die so mit dem Stalagmometer bestimmten Oberflächenspannungen mit denen einer reinen Natriumglykocholatlösung zu vergleichen. So einleuchtend der Gedanke zunächst erscheint, so stellten sich doch bei tieferem Eindringen in das Problem immer wieder neue Schwierigkeiten entgegen. Die Galle enthält ja außer den gallensauren Salzen noch etliche andere oberflächenaktive Substanzen: Fettsäuren, Lecithin, Fett, Cholesterin, außerdem enthält die Galle noch Bilirubin, anorganische Salze (1, 2, 3, 4) und Schleim, welche wohl an sich nicht oberflächenaktiv sind, wohl aber die Oberflächenaktivität der gallensauren Salze in merklicher Weise beeinflussen. Schließlich muß auch der Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration (5, 6, 7) auf die Oberflächenaktivität berücksichtigt werden, da er von ganz ausschlaggebender Bedeutung ist und ganz besondere Beachtung verdient.

Zunächst ging ich daran, Leichenblasengalle und Duodenalsäfte zu verdünnen und die Tropfenzahl bei verschiedener Verdünnung zu

Tabelle I.

Tropfenzahlen[1]) (Normaltropfen) verschiedener Verdünnung von Duodenalsäften und Gallen ohne Berücksichtigung der Wasserstoffionenkonzentration.

	Unverd.	1:2	1:5	1:10	1:20	1:30	1:40	1:50	1:70	1:100	1:200
Duodenalsaft 1	169	—	173	155	133	122	118	113	108	103	—
Duodenalsaft 2	165	173	182	174	147	130	123	122	118	113	105
Duodenalsaft 3	172	180	153	134	123	121	115	113	108	105	—
Leichengalle	102	150	153	156	147	147	147	146	145	139	131

bestimmen (Tabelle I). Es ergab sich bei den meisten Duodenalsäften und Gallen bei stärkerer Konzentration eine zur Abszisse fast parallele Kurve, die dann bei zunehmender Verdünnung zuerst allmählicher, dann recht steil abfiel. Dabei beobachtete ich bald, daß manche Gallen und Duodenalsäfte bei stärkerer Konzentration einen hohen Verlauf zeigten, und daß daher zunächst der Anschein erweckt wurde, als ob die Galle sehr reich an oberflächenaktiven Substanzen sei, während bei stärkerer Verdünnung die Kurve steiler abfiel als bei einer anderen Galle, welche bei höherer Konzentration niedrigere Tropfenzahlen zeigte. Es bestanden mehrere Möglichkeiten, diese Tatsache zu erklären. Einmal konnte in der Galle außer dem gallensauren Salze eine größere Menge anderer kapillaraktiver Substanzen beigemengt sein, welche bei Verdünnung einen anderen Verlauf der Kurve ergeben als die gallensauren Salze allein; als solche Substanzen kommen vor allem die Seifen in Betracht — oder die Galle mit der anfangs hohen Tropfenzahl enthielt in vermehrter Menge Salze, welche wohl nicht selbst oberflächenaktiv sind, aber die Oberflächenaktivität kapillaraktiver Substanzen nicht unwesentlich beeinflussen (s. oben), außerdem übt die Wasserstoffionenkonzentration einen bedeutenden Einfluß auf die Oberflächenspannung aus, da ja bekanntlich oberflächenaktive Säuren eine bedeutend größere Oberflächenaktivität haben als ihre Salze (Tabelle II und III). Schließlich zeigte sich, daß auch der Schleim bei der unverdünnten bzw. nur wenig verdünnten Galle einen Einfluß auf die Tropfenzahl hat. Auf den Einfluß des Schleimes komme ich noch zurück. Es ergab sich also aus diesen Erfahrungen die Folgerung, bei konstantem Salzgehalt und bei konstanter Wasserstoffionenkonzentration zu arbeiten und den Einfluß der übrigen kapillaraktiven Substanzen und Schleim zu beachten, um vergleichbare Werte zu erhalten. Ich dachte zunächst daran, die Bestimmung bei sehr hoher

[1]) Normaltropfen = Tropfenzahl, bezogen auf ein Stalagmometer, das 100 Wassertropfen liefert (*J. Traube*, diese Zeitschr. 24, 243). Ich habe, dem Vorgehen *Traubes* und anderer folgend, alle Oberflächenspannungen in Normaltropfen ausgedrückt.

Tabelle II.

Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration auf die Oberflächenspannung verschiedener Natriumglykocholatlösungen und Duodenalsäfte.

p_H:	7,5	7,0	6,5	6,0	5,8	5,6	5,4	5,2	5,0	4,8	4,6	4,4	4,2	4,0	3,5	3,0
3 mg-Proz. Na-Glyk. . . .	—	—	—	—	—	104	—	—	118	—	—	122	—	123	123	122
0,5 proz. Na-Glyk. . . .	158	—	194	—	188	—	—	—	—	—	—	—	—	158	158	158
Duodenalsaft 1:100 . . .	—	—	—	107	108	111	—	—	—	121	123	123	124	124	124	—
Duodenalsaft unverdünnt	161	171	—	177	—	—	—	—	185	—	180	—	—	163	155	—

Tabelle III.

Einfluß der Konzentration auf die Oberflächenspannung von Natriumglykocholatlösung bei kongosaurer Reaktion.

Na-Glyk.-Lösung . . .	1,25	2,5	5	10	20	50	100	200	500	% mg
Tropfenzahl	103	121	132	140	145	148	153	155	158	—

Salzkonzentration vorzunehmen, um so die Empfindlichkeit der Methode zu steigern und bei hoher Salzkonzentration von geringen Schwankungen des Salzgehaltes, wie sie durch den verschiedenen Salzgehalt der verschiedenen Gallen gegeben waren, unabhängig zu sein. Aus diesem Grunde untersuchte ich auch den Einfluß der hohen Kochsalzkonzentration auf die gallensauren Salze (Tabelle IV). Ich verließ

Tabelle IV.

Einfluß verschiedener Kochsalzkonzentrationen auf die Oberflächenaktivität einer Natriumglykocholatlösung von konstantem Natriumglykocholatgehalt bei neutraler (Lackmus) und kongosaurer Reaktion.

Lösungsmittel	Wasser	0,32 proz.	0,63 proz.	1,25 proz.	2,5 proz.	5 proz.	10 proz.	20 proz.	30 proz.
		Na Cl							
Lackmus neutraler Reaktion	107	111	119	125	129	134	137	143	151
Kongosauer	131	131	131	132	133	133	137	142	129

später diese Absicht wieder, weil ich einfacher durch die nunmehr angewandte Methode zum Ziele kam. Es sei aus diesen ausführlichen Untersuchungen, weil sie für die nunmehr ausgearbeitete Methode nur von sehr untergeordnetem Interesse sind, nur mitgeteilt, daß bei lackmusalkalischer Reaktion der die Oberflächenspannung erniedrigende Einfluß der Salze (NaCl, KCl, $CaCl_2$, Na_2HPO_4) auf die Oberflächenspannung der Natriumglykocholatlösung sehr groß ist, während er bei kongosaurer Reaktion überhaupt erst bei einer Salzkonzentration von über 1 % mit dem Stalagmometer nachweisbar wird. Bei zu-

nehmender Salzkonzentration nimmt die Tropfenzahl auch bei kongosaurer Reaktion zu, um aber bei sehr hoher Konzentration wieder abzufallen (4). Ich bin diesen Beobachtungen, die außerhalb meines gesteckten Zieles liegen, nicht weiter nachgegangen. Eine zweite Eigentümlichkeit fiel mir schon auf, als ich die ersten Gallen untersuchte. Ich fand nämlich, daß manche Gallen ohne Verdünnung eine ganz geringe Tropfenzahl aufwiesen, um dann gewaltig bei Verdünnungen, z. B. 1 : 2, in die Höhe zu schnellen. Untersucht man reine Natriumglykocholat- oder Natriumaurocholatlösung bis zu 2%, so findet man bei gleichbleibender Wasserstoffionenkonzentration mit zunehmender Konzentration auch zunehmende Tropfenzahlen, d. h. zunehmende Oberflächenspannungserniedrigung, die sich bei hohen Konzentrationen nicht viel ändern, aber jedenfalls nicht den bei der Galle beobachteten Abfall zeigten, der bei letzterer auch bei genauerer Innehaltung der p_H nachzuweisen war. Mir fiel gleich von vornherein auf, daß es sich immer um sehr schleimhaltige, sehr fadenziehende Gallen handelte, welche die Eigentümlichkeiten besonders ausgesprochen zeigten, und ich konnte auch durch Hinzufügen von „Schleim", den ich aus der Galle gewann, zu Natriumglykocholatlösung beweisen, daß es der Schleim ist, welcher die Tropfenzahl bei hoher Konzentration drückt (s. Tabelle VI). Bei welcher Wasserstoffionenkonzentration sollte ich nun die Bestimmung vornehmen? Ich beobachtete bei verschiedener Wasserstoffionenkonzentration, dabei erkannte ich, daß die Tropfenzahl bei lackmusalkalischer Reaktion weitgehend unabhängig von der Wasserstoffionenkonzentration ist — fügt man allerdings zuviel NaOH hinzu, so kommt eine Salzbeeinflussung zustande, denn dieselbe Beeinflussung kann man auch durch äquivalente Kochsalzmengen erreichen. Andererseits erwies sich die Tropfenzahl bei kongosaurer Reaktion ebenfalls stabil, zwischen diesen Werten war große Labilität der Tropfenzahl zu beobachten (5). Hat man eine konzentrierte Galle vor sich und versetzt sie stufenweise mit einigen Tropfen verdünnter HCl, so steigt die Tropfenzahl zunächst deutlich an, um dann, wenn auch deutliche Ausfällung eintritt, auf einen Wert zu fallen, der fast immer dicht bei 158 Normaltropfen liegt. Verdünnt man dann dieselbe Galle weiter und kommt man so weit, daß die Tropfenzahl bei alkalischer Reaktion unter dieser Zahl liegt, so steigt die Tropfenzahl bei zunehmender Wasserstoffionenkonzentration bis zu dieser Zahl an (Abb. 1). Ich dachte anfangs daran, den Schnittpunkt der „alkalischen" und der

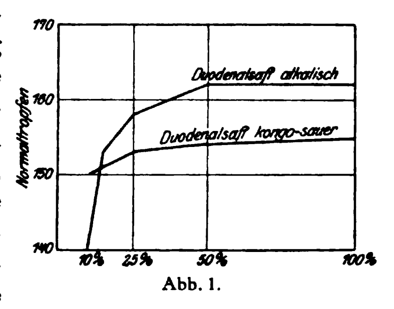


Abb. 1.

Tabell…

Änderung der Oberflächenspannung bei der Verdünnung von Duodenalsaft… Substanzen bei alkalisch…

Duodenalsaft				0,2 proz. Na glyc.-Lösung			0,2 proz. Na glyc. + 0,9 proz. NaCl			0,2 proz. Na glyc. + Schleim			0,2 proz. Na glyc. + 0,9 proz. NaCl + 0,2 proz. Na olein.		
Verdünnung		Tropfenzahl	Differenz zwisch. alk. u. kongos. Reaktion	Verdünnung	Tropfenzahl	Differenz	Verdünnung	Tropfenzahl	Differenz	Verdünnung	Tropfenzahl	Differenz	Verdünnung	Tropfenzahl	Differ…
unverd.	alkal.	161	0							Schleim noch Na glyc. aus der Galle enthaltend					
	sauer	161													
1:5	alkal.	169	—8												
	sauer	161													
1:10	alkal.	155	16	alkalisch unverd. kongos.	161	—5	unverd.	161	—5	unverd.	126		unverd.	189	
	sauer	161			150			156							
1:20	alkal.	141	12	0,1 proz.	137	16	0,1 proz.	151	—2	0,1 proz.	120		1 : 5	180	-25
	sauer	153			153			153						155	
1:40	alkal.	125	22	0,05 „	119	31	0,05 „	128	22	0,05 „	119	36	1 : 10	167	-20
	sauer	147			150			150			155			147	
1:80	alkal.	113	28	0,02 „	110	35	0,02 „	115	30	0,02 „	111	36	1 : 20	139	[illegible]
	sauer	141			145			14[illegible]			147			139	
1:160	alkal.	105	23	0,01 „	106	35	0,01 „	108	33	0,01 „	107	33	1 : 40	123	[illegible]
	sauer	128			141			141			140			133	
1:320	alkal.			0,005 „	103	30	0,005 „	105	28				1 : 80	105	[illegible]
	sauer	112			133			133						119	
1:480	alkal.			0,0025 „	102	19	0,0025 „	102	19				1 : 160	102	[illegible]
	sauer	105			121			121						104	

„sauren" Kurve als Grundlage der Bestimmung zu nehmen, er erwies sich aber als zu ungenau und wegen der unzureichenden Verdünnung zu stark abhängig vom Salzgehalt und dem Gehalt anderer kapillaraktiver Substanzen der Galle. Wie war nun die annähernde Konstanz der Tropfenzahl bei mittlerer und höherer Konzentration bei saurer Reaktion zu erklären? Um darüber Aufschluß zu bekommen, untersuchte ich reine Natriumglykocholatlösung bei verschiedener p_H und stieß bei mittlerer und höherer Konzentration auf dieselbe Zahl. Bei einer Konzentration von etwa 0,1 bis 0,5% Natriumglykocholat bei kongosaurer Reaktion (s. Tabelle III) befinden wir uns bereits in dem

Natrium glycocholicum-Lösung ohne und mit Zusatz verschiedener kongosaurer Reaktion.

proz. Na glyc. 0,9 proz. Na Cl etwa 0,1 proz. lesterin (nicht ollst. gelöst)			0,1 proz. Na glyc. + etwa 0,1 proz. Na palmihinic.			0,1 proz. Na glyc. + 0,4 proz. Na Cl + 0,1 proz. Bilirubin			0,1 proz. Na glyc. + 0,4 proz. Na Cl + 0,15 proz. Na palm. + 0,03 proz. Chol. + 0,04 proz. Acid. oleinicum			Duodenalsaft			Derselbe Duodenalsaft + etwa 0,15 proz. Cholesterin (nicht vollständig gelöst)		
Verdünnung	Tropfenzahl	Differenz	Verdünnung	Tropfenzahl	Differenz	Verdünnung	Tropfenzahl	Differenz	Verdünnung	Tropfenzahl	Differenz	Verdünnung	Tropfenzahl	Differenz	Verdünnung	Tropfenzahl	Differenz
	126			188			143			180			161			159	
n-rd.			unverd.			unverd.			unverd.			unverd.			unverd.		
	126			155			116			145			145			145	
: 5			1 : 2		-2	1 : 5		25	1 : 5			1 : 5			1 : 5		
				153			141										
	114			133			108			126			132			131	
10			1 : 4		17	1 : 10		30	1 : 10		16	1 : 10			1 : 10		
				150			138			142							
	108			115						109			120			120	
20		32	1 : 8		29	1 : 20			1 : 20		25	1 : 20		24	1 : 20		
	140	36		144			130			134			144				
	104			110						103			111			112	
40		27	1 : 16		25	1 : 40			1 : 40		18	1 : 40		25	1 : 40		24
	131			135			115			121			136			136	
				103									105			105	
80			1 : 32		20	1 : 80			1 : 60			1 : 80		16	1 : 80		16
	119			123			103			111			121			121	
													103				
			1 : 64						1 : 80			1 : 160		3	1 : 160		
				106						104			106			106	

Bereiche der Kurve, die fast parallel zur Abszisse läuft, d. h. es findet bei ziemlich hochgradiger Veränderung der Konzentration nur eine geringe Beeinflussung der Oberflächenspannung statt.

Diese Stabilität der Oberflächenspannung der Gallensäuren bei etwa 158 Normaltropfen ist eine Eigentümlichkeit der Gallensäuren, denn andere Fettsäuren zeigen wieder eine ganz andere Verlaufsform der Kurve. Daß der unverdünnte und wenig verdünnte Duodenalsaft auch bereits diese Oberflächenspannung hat, die sich in etwa 158 Normaltropfen kund tut, zeigt auch, daß die Gallensäuren den Hauptbestandteil der Kapillaraktivität der Galle bilden. Andere Fettsäuren zeigen

bei steigender Konzentration höhere Tropfenzahlen oder haben wegen der Unlöslichkeit bei saurer Reaktion keine oberflächenaktive Kraft. Die beim Duodenalsaft hauptsächlich in Betracht kommenden Seifen haben wohl als solche eine große oberflächenspannungserniedrigende Kraft, aber beim Ansäuern der Seifenlösungen fallen die entstehenden freien Fettsäuren zum großen Teil aus und üben somit einen nur geringen Einfluß auf die Oberflächenspannung aus (Tabelle V). Ge-

Tabelle V.

Oberflächenspannung verschiedener konzentrierter Natriumoleinatlösungen bei alkalischer und kongosaurer Reaktion.

	Unverd.	1:10	1:20	1:100
0,09 proz. Natr.-Oleinat, alkal. Reaktion	210	129	110	101
Dieselbe, kongosaure Reaktion	101	101	101	101

legentlich beobachtete ich bei sehr schleimhaltigen Duodenalsäften bei kongosaurer Reaktion eine höhere Tropfenzahl; beobachtet man eine solche angesäuerte Galle aber längere Zeit, so sieht man, daß schließlich auch diese Galle die oben angegebene Tropfenzahl gibt, eine Tatsache, die wohl darauf zurückzuführen ist, daß zunächst mehr Gallensäure in Lösung gehalten wird (Schutzkolloide ?). Während nun bei alkalischer Reaktion die Tropfenzahl weitgehend abhängig ist von dem Salzgehalt der Lösung, so erwies sich die Tropfenzahl bei kongosaurer Reaktion als weitgehend unabhängig vom Salzgehalt der Lösung; weitere Einflüsse auf die durch die Gallensäuren bewirkte Oberflächenaktivität mußten untersucht werden. Es mußten die übrigen kapillaraktiven Substanzen der Galle einer näheren Untersuchung unterzogen werden. Natriumpalmitat oder -oleat erwiesen sich als sehr oberflächenaktiv, aber säuerte man eine Seifenlösung an, so verschwand die Oberflächenaktivität vollständig (s. oben). Desgleichen erwies sich ein Zusatz von Natriumoleat und -palmitat zu einer alkalischen Natriumglykocholatlösung als sehr aktiv, während sich beim Ansäuern bis zu kongosaurer Reaktion nur bei großer Fettsäurenkonzentration in der konzentrierten Natriumglykocholatlösung ein Einfluß geltend machte. Auch ein Zusatz von Cholesterin zu einem Gemisch von Natriumglykocholat und -taurocholat, -palmitat und -oleat erwies sich als unwirksam, allerdings blieb ein Teil des mit der Lösung geschüttelten Cholesterins ungelöst. Um bessere Lösungsverhältnisse zu geben, schüttelte ich Cholesterin mit Duodenalsaft, auch hier löste sich nur ein Teil auf, jedenfalls war auch hier keine Beeinflussung festzustellen. Vom Einfluß des Schleimes habe ich schon gesprochen, Schleim selbst ist oberflächeninaktiv. Ich prüfte noch den Einfluß niederer Fettsäuren, Buttersäure und Essigsäure.

und fand, daß erst ziemlich erhebliche Mengen — jedenfalls Mengen, die ein Vielfaches der vorhandenen Gallensäuren darstellen — einen merklichen Einfluß auf die Kapillaraktivität der Gallensäurelösung ausüben. Der Gallenfarbstoff selbst ist oberflächeninaktiv. Auf seinen Einfluß auf die Oberflächenaktivität komme ich noch später zurück. Der Einfluß des Peptons auf die Kapillaraktivität einer Gallensäurelösung wurde beobachtet und erst bei höherer Konzentration als schwach wirksam gefunden.

Verdünnte ich nun einen Duodenalsaft bei alkalischer Reaktion und säuerte ich jede alkalische Verdünnung auch bis zur kongosauren Reaktion an, stellte ich außerdem eine Natriumglykocholatlösung in verschiedenen Verdünnungen her, so stimmten entweder die Tropfenzahlen bei einer bestimmten Verdünnung bei saurer Reaktion überein oder bei alkalischer Reaktion (Tabelle VI, Spalte 1 und 2). Wir haben schon erfahren, daß NaCl (wie andere Elektrolyte) bei alkalischer Reaktion die Oberflächenspannung einer Natriumglykocholatlösung weiter erniedrigt, während es bei kongosaurer Reaktion bei gleicher Konzentration keinen Einfluß ausübt. Dadurch wird die Differenz der Tropfenzahlen zwischen alkalischer und kongosaurer Reaktion bereits vermindert und der des Duodenalsaftes angenähert (Tabelle VI, Spalte 1 bis 3). Aber die geringen Salzkonzentrationen, wie sie bei der Duodenalsaftverdünnung vorhanden sind, genügen doch nicht, um die Tropfenzahl bei alkalischer Reaktion so zu erhöhen und somit die Differenz zwischen Tropfenzahlen bei alkalischer und kongosaurer Reaktion so zu verkleinern, wie sie tatsächlich im verdünnten Duodenalsaft vorhanden ist.

Wir haben weiter gehört, daß die Seifen einen Einfluß ausüben, und in der Tat stimmt nun eine gallensaure Salzlösung, der Kochsalz und Seife zugesetzt ist, bei alkalischer und saurer Reaktion weit besser mit einer Galle in verschiedenen Verdünnungen überein (s. Tabelle VI). Verdünnt man nun aber eine Galle z. B. auf das 10-, 20-, 40-, 80-, 160fache, bestimmt die Tropfenzahl und vergleicht diese mit denen einer reinen Natriumglykocholatlösung, so errechnet man bei stärkerer Verdünnung in einem Teile der Fälle einen höheren Natriumglykocholatgehalt des Duodenalsaftes als bei weniger weitgehender Verdünnung. Der Unterschied ist um so größer, je weniger konzentriert an Gallensäuren der ursprüngliche Duodenalsaft ist. Wie ist dieser Unterschied zu erklären? Die ganz hohen Konzentrationen kommen schon wegen ihrer geringen Änderung der Oberflächenspannung bei Verdünnung auf das Doppelte, Dreifache, Vierfache usw. für die Bestimmung der Gallensäuren nicht in Betracht, wie aber liegen die Verhältnisse bei mittleren und niedrigeren Konzentrationen? Der Zusatz von „Schleim" zu Natriumglykocholatlösungen lehrt, daß bei hinreichender Verdünnung

der „Schleim“ keinen Einfluß mehr ausübt; auch Zusatz der Seifen in der Konzentration, wie sie in der Galle vorkommen, üben selbst bei Gegenwart von Schleim keinen Einfluß auf die Oberflächenspannung aus; und wenn sie einen Einfluß ausübten, so sollte man annehmen, daß sie bei höherer Konzentration stärker wirkten, d. h. die Tropfenzahl erhöhten. Das Gegenteil beobachtete ich. Ich setzte zu Natriumglykocholatlösung noch Bilirubin hinzu und fand schwankende Werte, bald entsprachen sie denen der reinen angesäuerten Natriumglykocholatlösung, und bald gaben sie niedrigere Tropfenzahlen. Den Grund dieses Schwankens fand ich bald, als ich das Aussehen der Lösungen beobachtete. War ein herabsetzender Einfluß zu beobachten, so war das Bilirubin aus der Lösung ausgeflockt, war kein Einfluß zu bemerken, so konnte man wohl eine Opaleszenz oder leichte Trübung, aber keine Ausflockung beobachten. Ich schloß also aus dieser Beobachtung, daß bei etwas stärkerer Konzentration die Gallensäuren mit ausfallendem Bilirubin oder etwa ausfallenden Fettsäuren mitgerissen und adsorbiert werden, es sind zwar nur geringe Mengen, die auch bei dieser starken Verdünnung ausfallen, aber bei dieser Verdünnung ist die Tropfenzahl auch so empfindlich gegen geringe Konzentrationsänderungen, daß wohl dieser Vorgang sich so erklären läßt, um so mehr, als bei Duodenalsäften mit hohem Gallensäuregehalt, bei denen man also weitgehend verdünnen muß, dieser Unterschied im Werte bei verschiedener Konzentration nicht vorhanden oder nur unerheblich ist (s. Tabelle VI). Daß Adsorptionsvorgänge bei so hoch kapillaraktiven Substanzen wie die Gallensäuren eine hochbedeutende Rolle spielen, geht schon daraus hervor, daß eine Gallensäurelösung von bestimmter Konzentration durch Filtrieren ihre Oberflächenaktivität verringert und daß geringe Mengen Tierkohle genügen, um die Oberflächenaktivität einer Gallensäurelösung zu beeinflussen (Tabelle VII).

Tabelle VII.

Einfluß der Adsorption an Tierkohle auf die Tropfenzahl von Natriumglykocholatlösungen.

0,05 proz. Na-Glyk. kongosauer	Dieselbe Lösung 20 ccm kongosauer mit 0,7 mg Tierkohle 1 Min. geschüttelt	Dieselbe Lösung nochmals 1 Min. mit insgesamt etwa 1,2 mg Tierkohle geschütt.	0,025 proz. Na-Glyk. kongosauer	Nebenst. Lösung 20 ccm mit 0,8 mg Tierkohle 1 Min. geschüttelt	Andere 20 ccm mit 0,5 mg Tierkohle 1 Min. geschüttelt
Tropfenzahl					
133	132	128	120	113	115

Ich hätte nun, um den Einfluß der ausfallenden und adsorbierenden Substanzen zu berücksichtigen, eine Standardkurve anlegen können, die solche Substanzen, z. B. Bilirubin, enthält, aber bei der künstlichen Darstellung dieser Lösungen bekommt man je nach der Ausflockung

verschiedene Beeinflussung, wie schon oben erwähnt wurde. Daher sah ich davon ab und verdünne also so weit, bis keine sichtbare Trübung mehr zu beobachten ist. Wie schon erwähnt, stimmen ja bei ursprünglich hoher Gallensäurekonzentration im Duodenalsaft verschieden weitgehende (z. B. 1 : 100, 1 : 200) Verdünnungen sehr gut überein. Diese Tatsache brachte mich zu dem Entschluß, in dieser Weise zu verfahren.

Den Einfluß des Lecithins habe ich nicht im besonderen untersucht, denn da der oberflächenaktive Anteil des Lecithinmoleküls die Ölsäure ist, so habe ich bei meinen Untersuchungen über den Einfluß der Ölsäure weit größere Ölsäuremengen genommen als der Konzentration an Ölsäure und Lecithin in der Galle entspricht. Da das Lecithin nicht wasserlöslich und sehr schwer rein zu beschaffen ist, glaube ich durch den Ersatz durch Ölsäure den vorhandenen Einfluß des Lecithins weit besser berücksichtigt zu haben, als wenn ich versucht hätte, einigermaßen in Betracht kommende Mengen von Lecithin aufzulösen. Ich habe bisher nachgewiesen, daß wohl in der konzentrierten und wenig verdünnten Galle, insbesondere bei alkalischer, weniger aber doch noch nachweisbar bei kongosaurer Reaktion, die verschiedenen Bestandteile der Galle einen Einfluß auf die durch die Gallensäuren bedingte Oberflächenspannungserniedrigung ausüben, daß aber bei hinreichender Verdünnung dieser Einfluß der Beimengungen bei kongosaurer Reaktion nicht mehr nachweisbar ist. Nunmehr möchte ich noch zeigen, daß zur Galle zugesetztes Natriumglykocholat in den verdünnten Lösungen in der zugesetzten Menge wiedergefunden wird. Dabei ist es gleichgültig, ob ich das Natriumglykocholat zur konzentrierten Galle zusetze und dann verdünne, oder ob ich den Duodenalsaft erst verdünne und dann zur Verdünnung die entsprechenden Natriumglykocholatmengen zusetze. Ein Beispiel möge hier die Verhältnisse zeigen (Tabelle VIII).

Tabelle VIII.

Zusatz von Natriumglykocholat zu Duodenalsaft:

	unverdünnt 1 : 2	1 : 5	1 : 10	1 : 20	1 : 40	1 : 80	1 : 160 =	1 : 320
alkalisch . . .	172	177	158	134	118	110	104	—
kongosauer . .	156	155	151	149	143	137	123	108

Derselbe Duodenalsaft

+ 0,25 mg-Proz. Natrium alkalisch	127	120	110	—	—
Glykocholat kongosauer . : . .	151	145	138	125	109

Verdünnung 1 : 160 ergibt 1,57 mg-Proz. × 160 = 0,25 g-Proz. im unverdünnten Duodenalsaft.

Verdünnung 1 : 80 ergibt 3,00 mg-Proz. × 80 = 0,24 g-Proz. im unverdünnten Duodenalsaft.

Nach Zusatz von 0,25 % Natriumglykocholat ergibt:

Verdünnung 1 : 320: 1,6 mg-Proz. × 320 = 0,51 g-Proz.

1 : 160: 3,3 mg-Proz. × 160 = 0,53 g-Proz.

	Tropfenzahl		Tropfenzahl
Duodenalsaft 1 : 160 . . .	108	Duodenalsaft 1 : 80	123
Auf 12ccm desselben 0,19ccm 0,1proz. Natriumglykocholatlösung	126	Auf 12ccm desselben, 019ccm 0,1 proz. Natriumglykocholatlösung	137
Weitere 0,38 ccm 0,10 proz. Natriumglykocholatlösg.	137	Weitere 0,70 ccm 0,1 proz. Natriumglykocholatlösg.	147
Weitere 0,52 ccm 0,10 proz. Natriumglykocholatlösg.	147		

		berechnet	beobachtet
Verd. 1 : 160 = 1,57 mg-Proz.			
	+ 1,6 mg-Proz.	= 3,17 mg-Proz.	3,3 mg-Proz.
	+ 3,2 ,,	= 6,37 ,,	6,7 ,,
	+ 12,4 ,,	= 18,8 ,,	17 bis 23 ,,
Verd. 1 : 80 = 3,0 mg-Proz.			
	+ 3,2 ,,	= 6,2 ,,	6,7 ,,
	+ 12,8 ,,	= 19,0 ,,	17 bis 23 ,,

Natriumtaurocholat zeigt im Prinzip das gleiche Verhalten wie Natriumglykocholat. Auch hat das Natriumtaurocholat bei den in Betracht kommenden Konzentrationen eine die Oberflächenspannung erniedrigende Kraft, die sich nur wenig von der des Natriumglykocholats unterscheidet, so daß ich davon absehen konnte, eine Standardlösung herzustellen, welche beide Gallensäuren enthält. Es wird also bei meiner Methode die Oberflächenspannung bestimmt, welche durch die in der Galle bei der entsprechenden Verdünnung und bei der kongosauren Reaktion gelösten oberflächenaktiven Stoffe bedingt wird, und diese die Oberflächenspannung erniedrigende Kraft wird auf Glykocholsäure bezogen, wobei ich mir bewußt bin, daß sich auch die Taurocholsäure an der Oberflächenspannungserniedrigung beteiligt.

Meine Erfahrungen ergeben, daß alle Methoden, welche den Salzgehalt und die Wasserstoffionenkonzentration nicht berücksichtigen, oder welche in zu konzentrierten Duodenalsaftextraktionen arbeiten, zu falschen oder ungenauen Ergebnissen führen müssen. Weiter möchte ich noch erwähnen, daß eine Extraktion mit Äther bei saurer Reaktion, um die Fettsäuren zu entfernen, unzulässig ist, weil die Gallensäuren in nicht unerheblicher Weise in Äther löslich sind und bei einigermaßen höherer Konzentration durch Äther teilweise ausgeschüttelt werden können, wovon ich mich bei reinen Natriumglykocholatlösungen überzeugen konnte. Aus diesen Gründen können die Bestimmungsmethoden von *Beth* (8), und wegen der Nichtberücksichtigung des Salzgehaltes und der Wasserstoffionenkonzentration auch die Schätzungsmethode von *Lepehne* (9) keine richtigen Ergebnisse liefern.

Zum Schluß möge die Ausführung der Methoden folgen. Der Duodenalsaft wird vom nüchternen Patienten — sei es durch spontanes Abfließen, sei es durch Ansaugen mit der Rekordspritze — gewonnen,

wobei darauf zu achten ist, daß der Duodenalsaft nicht durch Magensaft verunreinigt ist, was sich durch einen gelben Niederschlag oder Trübung ohne weiteres zu erkennen gibt. Alsdann wird möglichst frisch der völlig klare Duodenalsaft, der also nicht filtriert werden darf, in folgender Weise untersucht. Bei der gewöhnlich vorhandenen, schwach alkalischen Reaktion wird der Duodenalsaft zunächst etwa auf das 50fache verdünnt, dann mit 1 bis 2 Tropfen etwa 15proz. Salzsäure deutlich kongosauer gemacht und seine Tropfenzahl bestimmt. Übersteigt die Tropfenzahl 135 Normaltropfen, so wird eine stärkere Verdünnung hergestellt, etwa 75- oder 100fach usw. Sollte die zunächst hergestellte 50fache Verdünnung zu weit gegangen sein, so stellt man sich eine 25fache oder 20fache oder gar 10fache Verdünnung her, um mit der Tropfenzahl in den Bereich von 105 bis 135 Normaltropfen zu gelangen. Alsdann liest man in der Abb. 2 den Natriumglykocholatgehalt ab und multipliziert mit der Verdünnungszahl. Wie aus meinen obigen Ausführungen hervorgeht, soll man immer so weit wie möglich verdünnen, d. h. so weit, bis man in den Bereich von 105 bis 115 Normaltropfen gekommen ist. Bei dem Gebrauch des Stalagmometers möchte ich noch besonders auf die Vorschrift *Traubes* hinweisen, so langsam tropfen zu lassen, daß *höchstens* 20 Tropfen in der Minute herunterfallen, um gut übereinstimmende Zahlen zu erhalten. Ich habe bei 14 bis 16 Tropfen in der Minute gearbeitet und dabei in der gleichen Lösung höchstens Unterschiede von 0,3 Tropfen meines Stalagmometers erhalten. Ich arbeitete mit einem geraden Stalagmometer von 37,3 Tropfen Wasser bei 20°. Die Abtropfgeschwindigkeit regulierte ich mit einem Schlauche, der oben am Stalagmometer angebracht war, durch mehr oder weniger starkes Herunterziehen des Schlauches konnte ich auf einfache Weise die Tropfenzahl regulieren.

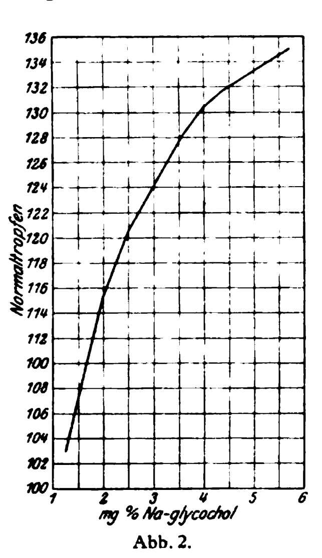


Abb. 2.

Literatur.

1) *J. Traube*, Ber. **42**, 2185. — 2) *Bayer*, diese Zeitschr. **13**, 238. — 3) *Joel*, ebendaselbst **119**, 93. — 4) *Berczeller*, **66**, 173. — 5) *Schemensky*, ebendaselbst **105**, 229. — 6) *J. Traube*, Intern. Zeitschr. f. physik.-chem. Biol. **1**, 479. — 7) *Windisch* und *Dietrich*, diese Zeitschr. **97**, 135. — 8) *H. Beth*, Wien. Arch. f. inn. Med. **2**, 563. — 9) *Lepehne*, Verhandl. d. deutsch. Ges. f. inn. Med. 1922, S. 470.

Über die Sedimentierung von Suspensionen und die Senkung der roten Blutkörperchen.

Von

L. Berczeller und H. Wastl.

(Aus dem physiologischen Institut der Universität Wien.)

(Eingegangen am 18. Juni 1923.)

Die Senkung der roten Blutkörperchen kann in mancher Beziehung mit der Sedimentierung von Suspensionen und mit der Flockung von kolloiden Lösungen verglichen werden, wobei die große Konstanz der Teilchengröße bei den roten Blutkörperchen sie für die Untersuchungen dieser Erscheinungen sehr geeignet erscheinen läßt, wenn es gelingt, die biologischen Faktoren näher zu charakterisieren, welche den Senkungsvorgang beeinflussen.

Die neueren Untersuchungen haben sehr viel zur Klärung des Vorganges der Senkung der roten Blutkörperchen von biologischen Gesichtspunkten aus beigetragen, aber trotzdem ist die Frage nach dem Mechanismus dieser Senkung noch keineswegs vollständig gelöst. Andererseits haben die Untersuchungen von *Perrin*, *Smoluchowski*, *Oden* in den letzten Jahren in der Aufklärung der Sedimentierungserscheinungen im allgemeinen große Fortschritte gebracht, wobei die Analyse von der Beobachtung immer nur eines sich bewegenden Teilchens ausgegangen ist.

Dieser Gedankengang wurde auch wiederholt bei der Senkung der roten Blutkörperchen verfolgt. Ob dies allgemein gültig ist, ist bei den Sedimentierungsvorgängen sehr fraglich. Vielmehr ist es sehr wohl möglich, daß auf kleine Entfernungen wirksame Fernkräfte von besonderer Bedeutung beim Zustandekommen der Erscheinungen sein können. Wir sind gewöhnt, solche Fernkräfte anzunehmen, um die Kohäsion bei festen Körpern zu erklären. In Flüssigkeiten ist die Oberflächenspannung ein Ausdruck der Kohäsionskraft. Die Wirkung der Oberflächenspannung macht sich nun nach unserer Auffassung nur auf sehr geringe Entfernungen hin geltend, da die Dichte der Oberflächenschichten ein nur mit sehr niedrigen Zahlen zu multiplizierendes Mehrfaches des Molekulardurchmessers ist.

Dagegen haben schon die *Liebreich*schen[1]) Untersuchungen über den „toten Raum“ gezeigt, daß wir sogar makroskopisch von der

[1]) Zeitschr. f. physik. Chem. 5, 529ff., 1890.

Oberfläche ausgehende, sichtbare Gebiete als anders reagierend beobachten können. Es müssen sich also von der Oberfläche noch in ziemlicher Entfernung die Flüssigkeitsschichten anders verhalten wie im Innern der Flüssigkeit selbst. *Liebreich* hat diese seine Beobachtungen mit den Vorgängen in den Zellen in Zusammenhang gebracht und angenommen, daß bedeutende Teile der Zellen sich als „tote Räume" verhalten[1]).

Die physikalische Durchforschung dieses Gebietes ist heute noch im Anfang, und da in vielen Beziehungen die biologischen Objekte für die Untersuchungen viel geeigneter sind als die anorganischen, so ist es zu erwarten, daß für die Erforschung dieser Infrakapillaritätserscheinungen eben die Untersuchung der biologischen Objekte einen wichtigen Impuls geben wird. Wir haben eigentlich so konstant zusammengesetzte und insbesondere nach Form und Größe so konstante Gebilde, wie sie uns die Zellen darstellen, für die Untersuchung dieser Erscheinungen der 5 μ Dimensionen, aber auch noch für weit kleinere, im anorganischen Gebiete nicht.

Für die physikalische Untersuchung muß aber die biologische vorbauen, da die feinere messende Erforschung dieses Gebietes es gezeigt hat, daß bei der Bewegung dieser Teilchen eine sehr große Variation der Daten eben in der *biologischen* Variation der Bedingungen liegt.

Auf einige dieser Erscheinungen soll in den nächsten Abhandlungen eingegangen werden; an dieser Stelle soll nur der direkte Beweis erbracht werden, daß sogar bei Sedimentierungsvorgängen in anorganischen Suspensionen Kohäsionsfernkräfte wirksam sein können, daß man also die Sedimentierung oder auch die Senkung der roten Blutkörperchen nicht als die Bewegung eines Teilchens *allein* betrachten kann. Dieser Beweis läßt sich am einfachsten mit Kaolinsuspensionen erbringen. Wenn wir Kaolinsuspensionen, z. B. in der Stärke von 1 bis 10%, mit Wasser bereiten und mit den so hergestellten Suspensionen (z. B. 1-, 2-, 5- oder 10proz.) eine Reihe von Eprouvetten füllen, so können wir beobachten, daß, während mit 10proz. Suspension gefüllte Röhrchen sich ganz klar niedersetzen, in den mit verdünnterer

[1]) Die neueren Untersuchungen haben bewiesen, daß die Oberflächen bei chemischen Reaktionen nicht nur tote Räume bilden können, sondern daß es sogar zu einer mächtigen Beschleunigung bestimmter Reaktionen an den Oberflächen kommen kann, so daß die *Liebreich*sche Verallgemeinerung der toten Räume für die Zellen keineswegs bestehen kann. Für uns handelt es sich nur darum, daß infolge der großen Entwicklung der Zelloberflächen jene Flüssigkeitsvolumina, in denen eine Verschiebung der Vorgänge in der Nähe der Oberflächen gegenüber dem Flüssigkeitsinnern beobachtet wurde, bei den Zellen ein bedeutendes, wenn nicht das ganze Volumen der Zellen ausmachen.

Suspension gefüllten Röhrchen immer ein feiner Schleier in der Lösung zurückbleibt, und zwar ist in den mit verdünnterer Suspension gefüllten Röhrchen dieser Schleier ein viel stärkerer als in den mit konzentrierteren Suspensionen gefüllten.

Tabelle. Eprouvetten bis etwa 130 mm mit der Suspension gefüllt. (Vertikal aufgestellt.)

Zeit	20 proz. Kaolinsuspension	10 proz. Kaolinsuspension	5 proz. Kaolinsuspension	1 proz. Kaolinsuspension
Nach 20h	38 mm: klar 92 mm: Bodensatz	11 mm: klar 69 mm: Trübg. 50 mm: Bodensatz	7 mm: klar 101 mm: Trübg. 22 mm: Bodensatz	10 mm: klar 114 mm: Trübg. 6 mm: Bodensatz
Nach weiteren 24h	59 mm: klar 71 mm: Bodensatz	91 mm: klar 39 mm: Bodensatz	20 mm: klar 86 mm: Trübg. (leicht) 24 mm: Bodensatz	15 mm: klar 107 mm: Trübg. 8 mm: Bodensatz
Nach weiteren 120h	klar; scharfe Grenze gegen Bodensatz	klar; scharfe Grenze gegen Bodensatz	leicht getrübt; unscharfe Grenze gegen Bodensatz	leicht getrübt; unscharfe Grenze gegen Bodensatz

Man muß also annehmen, daß in den mit konzentrierteren Suspensionen gefüllten Röhrchen die größeren Teilchen die kleineren Teilchen mit sich reißen und daß diese Wirkung mit der Entfernung der Teilchen immer kleiner und kleiner wird. Besonders interessant ist nun, daß schon eine so geringe Verschiebung in der mittleren Entfernung der Teilchen einen so wesentlichen Unterschied im Zustandekommen der Erscheinung hervorruft, was aber damit in sehr gutem Einklange steht, daß eben die Kohäsionskräfte einen fast sprunghaften Abfall ihrer Stärke mit der Entfernung aufweisen. Nun scheint aber, daß der Tätigkeitsbereich dieser Kräfte mit den Zelldimensionen engstens zusammenfällt und daß sie nicht nur als die in reinen Flüssigkeiten beobachteten Oberflächenkräfte in den Lebewesen tätig sind.

Wir wissen es sehr gut, daß die Klebeerscheinungen mit diesen Kohäsionskräften in engstem Zusammenhange stehen; in der Histologie und auch in der Serologie spielen aber die Klebeerscheinungen an Zellen (Interzellularsubstanzen, Agglutination) eine sehr große Rolle. In der Klebetechnik wissen wir, daß bestimmte Teilchengrößen lyophiler Kolloide, ob sie Eiweiß- oder Kohlehydratderivate sind, von besonderer Klebekraft sind (Dextrin, Gelatine, Casein). Dieselben Substanzen — was die Eiweißderivate betrifft — haben bei der Agglutination wie bei der Senkung der roten Blutkörperchen ganz spezifische Wirkungen, die *allein* durch ihre Anreicherung in der Oberfläche nicht erklärt

werden können, wie dies zuerst *Berczeller* und *Stanker*[1]) beschrieben haben und wie dies später von *Fåhreus*[2]), *Linzenmeyer*[3]), *Sterlinger*[4]), *Stöhr, Kanei*[5]) usw. bestätigt wurde. Beim weiteren Fortschreiten der Hydrolyse nimmt die klebende sowie die agglutinierende oder senkende Wirkung gleichmäßig ab, wie dies bei Pepton zur Beobachtung kommt (*Berczeller* und *Stanker, Fåhreus, Linzenmeyer, Starlinger* usw., l. c.). Von der Klebewirkung wissen wir, daß diese Wirkung nicht allein von der Klebesubstanz, sondern ebenso von den Oberflächen, die geklebt werden, abhängig ist, und daher kann man auch nicht sagen, daß *alle* wasserlöslichen Klebestoffe senkungsbeschleunigend wirken, nicht einmal, daß alle senkungsbeschleunigenden Stoffe bei allen Sedimentierungsvorgängen gleichmäßig einwirken.

Das schönste Beispiel bildet hierfür das Verhalten der Gelatine. Diese — eines unserer besten „Schutzkolloide" — bildet auf der anderen Seite eines der wirksamsten Mittel für die Aufhebung der Stabilität der roten Blutkörperchen. Am naheliegendsten wäre die Annahme, der Unterschied der Teilchengröße (mikroskopische Suspensionen gegenüber Suspensionskolloiden) bilde den wirksamen Faktor. Dies ist aber keineswegs der Fall, da man bei vielen Sedimentierungsvorgängen eine ganz ähnliche „Schutzwirkung" der Gelatine beobachten kann wie bei Kolloiden. Die Unterschiede liegen eben auch in den Differenzen der Oberflächen.

Die *Hirschfeld*- und *Klinger*sche Auffassung der Suspensionsstabilisierung von lyophilen Kolloiden sagt aus, daß wasserlösliche Bestandteile von geringerer Molekülgröße, die an der Oberfläche adsorbiert sind und die aus ihr verdrängt werden können, die Stabilisierung bewirken. Diese Annahme wurde auch für die roten Blutkörperchen gemacht. Es ist nun nicht wahrscheinlich, daß dies im allgemeinen für Fällungsreaktionen das wirksame Agens bildet. Einer von uns [*Berczeller*][6]) hat die Flockung von Celluloseäther (Äthyl- und Methylalkoholäther der Cellulose), die in Wasser kolloidal lösliche Verbindungen sind, untersucht und dabei sehr auffallende Analogien mit dem Verhalten der Eiweißflockungen beobachtet. Die Celluloseäther werden nicht nur durch Erhitzen ihrer Lösungen geflockt, sondern sie werden auch durch Alkaloidreagenzien, Phenol, einige Schwermetallsalze ebenso wie die Eiweißkörper gefällt, dagegen z. B. durch Sulfosalicylsäure nicht. Bei der chemischen Beständigkeit der Cellulose-

[1]) Intern. Zeitschr. f. physik.-chem. Biol. **3**, 133—136, 1917.
[2]) The Suspensions Stability of the Blood. Stockholm 1921.
[3]) Pflügers Arch. **186**, 272ff., 1921.
[4]) Diese Zeitschr. **122**, 105ff., 1921.
[5]) Pflügers Arch. **197**, 584ff., 1923.
[6]) Noch nicht veröffentlichte Versuche.

äther ist nun an eine hydrolytische Abspaltung bei ihnen nicht zu denken, trotzdem verhalten sie sich in ihrer Stabilität ganz ähnlich und bilden ähnliche lyophile kolloide Lösungen wie die Eiweißkörper. Deswegen müssen wir heute dabei bleiben, daß die fällende Wirkung jener Substanzen, welche auch eine Klebewirkung ausüben, nicht von einer Verdrängung anderer Substanzen aus der Oberfläche abhängig ist, sondern daß ihre destabilisierende Wirkung ebenso wie auch ihre Klebewirkung auch von den Oberflächen, auf welche sie einwirken, abhängt. Diese Annahme ist um so berechtigter, als für Kolloide und auch Halbkolloide die Adsorptionsverdrängung nicht in Betracht kommt, während diese bei Kristalloiden ein sehr wirksamer Faktor sein kann.

In diese Gruppe der Senkungsbeeinflussung gehört die Wirkung des Fibrinogens, Globulins und Albumins. Die symbate Veränderung der Fällungswirkung mit der Viskosität, die zunächst den auffallendsten Widerspruch mit der Mechanik gebildet hat, ist damit gut aufgeklärt, da wir ja wissen, daß auch die Klebekraft dieser Lösungen mit der Viskosität zunimmt[1]).

Nun kann man diese Wirkungen dadurch mehr in den Vordergrund bzw. Hintergrund stellen, indem man mit bestimmten Blutarten arbeitet. Beim Pferdeblute und im Plasma spielen diese Erscheinungen die Hauptursachen, bei Rinderblut dagegen bilden sie sicherlich nur eine Nebenbedingung, insbesondere wenn man es in defibriniertem Zustande untersucht. Schweineblut steht dem Rinderblute viel näher als dem Pferdeblute. Aus diesem Grunde haben *Berczeller* und *Stanker* (l. c.) für ihre Untersuchungen Rinder- bzw. Schweineblut gewählt, um unter einfacheren Bedingungen arbeiten zu können. *De Haans*[2]) entgegengesetzte Auffassung, daß nämlich die Agglutinabilität auch im Schweineblute die Hauptursache der Sedimentationswirkung ist, wurde inzwischen so mannigfach widerlegt, daß es sich erübrigt, darauf näher einzugehen.

Im Gegensatz zu den oberflächenaktiven viskosen kolloiden Lösungen hemmen die oberflächenaktiven kristalloiden Lösungen die Senkung der roten Blutkörperchen in sehr großem Maße. Sogar mit einer konzentrierten wässerigen Thymollösung läßt sich diese Erscheinung nachweisen (*Berczeller* und *Stanker*, l. c.). Ähnlich wirken

[1]) Es ist natürlich ganz sicher, daß diese Erscheinung, welche mit der Agglutinabilität der roten Blutkörperchen engstens zusammenhängt, nur als *eine* Bedingung der Senkung und nicht als ihre Ursache aufgefaßt werden kann. Die Agglutination der roten Blutkörperchen ist einerseits wegen der ungenügenden physikalischen Grundlagen, andererseits wegen der Mannigfaltigkeit der biologischen Erscheinungen auch heute noch sicher der wundeste Punkt der Senkungserscheinungen.

[2]) Diese Zeitschr. **86**, 298ff., 1918.

auch die kapillaraktiven Narkotika. In dieser Eigenschaft verhalten sich die roten Blutkörperchen gerade entgegengesetzt als die Kolloide und Suspensionen im allgemeinen. Bei kolloiden Lösungen konnten *Kruyt* und *Huyn*[1]), *Freundlich* und *Rona*[2]), *Berczeller*[3]) usw. eine Verstärkung der flockenden Wirkung der Salze durch kapillaraktive Substanzen beobachten; ganz ähnlich verhalten sich nach den Befunden von *Rona* und *György*[4]) Suspensionen. Die Senkung der roten Blutkörperchen wird dagegen gehemmt. Dies können wir nur durch eine Adsorptionsverdrängung erklären. Die Membran der roten Blutkörperchen enthält Substanzen, welche eine beschleunigende Wirkung auf die Senkung ausüben (Fibrinogen, Globulin, Lipoide usw.); durch die oberflächenaktiven Kristalloide werden diese verdrängt, die Senkung wird langsamer.

Wenn wir auch in dieser Gruppe der Sedimentierungserscheinungen — in einem Gebiete, wo Sedimentation von Suspensionen und Senkung von roten Blutkörperchen sich antibat verändern — eine einfache physikalische Deutung der Senkungsbeschleunigungen und Verlangsamungen geben können, da die besten Schutzkolloide die Senkung beschleunigen und diejenigen kapillaraktiven Substanzen, welche die Flockung sensibilisieren, die Senkung hemmen (auch wenn die roten Blutkörperchen vorher mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen wurden), so ergeben doch diese Tatsachen den besten Beweis, daß wir zunächst eine möglichst rein physikalische Analyse der Erscheinungen versuchen müssen, da selbst dann, wenn wir Blutkörperchen und Plasma oder Serum voneinander trennen, eine Mannigfaltigkeit der Erscheinungen auftritt, die sich schwer deuten läßt.

Berczeller und *Stanker* (l. c.) haben auch schon auf die Veränderung der Größe und Form der Oberfläche der roten Blutkörperchen hingewiesen; dies ist z. B. bei mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschenen roten Blutkörperchen zu beobachten, welche auch eine ganz wesentlich andere Senkungsgeschwindigkeit besitzen als die im Serum suspendierten. Die Oberflächenerscheinungen allein können sich aber in entgegengesetzter Richtung beeinflussen, und man muß sie daher zunächst voneinander trennen können. Zu diesem Zwecke werden die mechanischen Eigenschaften der Senkung herangezogen werden, welche auch für die Standardisierung der Senkungswerte von größter Bedeutung sind, und welche bis jetzt sogar für den klinischen Vergleich nur ganz ungenügend herangezogen wurden. Diese Eigenschaften werden in den folgenden Arbeiten untersucht.

---

[1]) Kolloidchem. Beihefte 5, 209, 1914.
[2]) Diese Zeitschr. 81, 87, 1917.
[3]) Ebendaselbst 84, 175, 1917.
[4]) Ebendaselbst 105, 133, 1920.

Experimentelle Untersuchungen über die Wirkung des Pankreaspreßsaftes auf den Stoffwechsel[1]).

Von

Dionys Fuchs und Emerich Schill.

(Aus der III. medizinischen Klinik der Universität Budapest.)

(Eingegangen am 18. Juni 1923.)

Unsere, die Wirkung des Pankreaspreßsaftes auf den Stoffwechsel und speziell auf den Gaswechsel betreffenden Untersuchungen bilden die Fortsetzung der Untersuchungen von *Bálint* und *Molnár*[2]) über die Wirkung des Pankreaspreßsaftes auf den Blutdruck. Diese Autoren erreichten beim Hunde und beim Kaninchen durch die intravenöse Injektion des Preßsaftes eine typische, akut einsetzende, kurz anhaltende und nach wiederholter Injektion wieder auftretende Blutdrucksenkung, welche den Gegensatz zur Adrenalinwirkung bildet. Die Wirkung ist weder durch Peptone, noch durch Cholin bedingt, sondern beruht nach ihnen auf einem spezifischen Pankreashormon, dessen Angriffspunkt an der Peripherie des Kreislaufapparates ist. Dieses Hormon dient nach ihnen zur Erhaltung des Gleichgewichtes gegenüber dem Adrenalin und besitzt auf diese Weise Bedeutung in der Erhaltung des Tonus im autonomen Nervensystem.

Die erste, durch unsere Experimente zu beantwortende Frage war die Wirkung des Pankreaspreßsaftes auf den Gaswechsel des normalen Tieres, während unsere zweite Aufgabe die Untersuchung jener Frage bildete, ob nicht die der des Adrenalins entgegengesetzte Wirkung des Pankreaspreßsaftes auf den Blutdruck auch im Gaswechsel zum Ausdruck kommt. Diese Frage ist mit jenen Untersuchungen

---

[1]) Diese Arbeit wurde im Juli 1914 abgeschlossen, äußerer Ursachen halber kommt sie erst jetzt zur Veröffentlichung.

[2]) *Bálint* und *Molnár*, Zeitschr. f. exper. Path. u. Therap. **11**, 333, 1912.

verbunden, welche der eine von uns [*Fuchs*[1])] zusammen mit *Roth* über die Wirkung des Adrenalins auf den Gaswechsel ausführte. Wir konnten unsere, das letztgenannte Problem betreffenden Untersuchungen gleich unter verschobenen innersekretorischen Verhältnissen ausführen, da die Wirkung des Adrenalins auf den Gaswechsel des normalen Tieres aus der experimentellen Arbeit von *Hári*[2]) bekannt ist. Zu diesem Zwecke wurden Hunde durch vollkommene Entfernung ihres Pankreas diabetisch gemacht und der Gaswechsel dieser, des Pankreashormons beraubter bzw. unter gesteigertem Adrenalintonus stehender Tiere wurde unter der Einwirkung des Pankreaspreßsaftes, des Adrenalins bzw. beider, gleichzeitig applizierten Hormone untersucht.

Wir halten die Anzahl unserer Experimente für ungenügend, um aus denselben bindende, in jeder Richtung gesicherte Schlüsse ziehen zu können, weil sie aber in einer gewissen Richtung zu gleichsinnigen Ergebnissen führten, teilen wir sie mit, damit andere Untersucher sie benutzen können.

Unsere Untersuchungen wurden an Hunden (Gewicht 4500 bis 13500 g) mit dem *Zuntz-Geppert*schen Apparat nach der Versuchseinrichtung von *Tangl* ausgeführt. Die Atmung der kurarisierten Tiere geschah mittels der *H. H. Meyer*schen Pumpe. Die Hunde hungerten 24 Stunden vor dem Versuche. Wir besitzen 16 Versuchsreihen, und zwar: sieben an normalen, neun an durch vorherige Pankreasexstirpation diabetisch gemachten Hunden. Die Exstirpation des Pankreas wurde nach der *Hédon*schen Methode in Morphieäthernarkose einseitig ausgeführt. Bei den Tieren trat ausnahmslos Glykosurie auf. *Verzár* und *Fejér*[3]) konnten zeigen, daß sich der respiratorische Quotient von pankreasexstirpierten Hunden nach intravenöser Dextrosezufuhr erhöht; daß aber andererseits diese Wirkung der Dextrose allmählich abnimmt und nach 4 Tagen kaum nachzuweisen ist; deshalb wurden unsere Untersuchungen 4 bis 7 Tage nach der Operation ausgeführt. Sämtliche operierten Tiere wurden nach Beendigung des Experimentes seziert; wir konnten uns auch auf diese Weise von der vollkommenen Entfernung des Pankreas überzeugen. In jeder Versuchsreihe wurde zuerst in drei bis vier Perioden der normale Gaswechsel der Tiere bestimmt, erst dann wurde der Pankreaspreßsaft eingespritzt. Der Pankreaspreßsaft wurde in frischem Zustande von der chemischen Fabrik von G. Richter bezogen. Aus dem fein zerhackten und mittels einer Handpresse unter nicht zu hohem Drucke ausgepreßten Pankreas wurden 10 bis 15 %, in einzelnen Fällen 20 % Preßsaft erhalten. Davon wurden nach erfolgter Filtrierung (Papier) 10 ccm eingeführt; der Blutdruck des Tieres wurde mittels des *Hürthle-Gad*schen Apparates am Kymographion registriert, auf diese Weise konnten wir die spezifisch blutdruckerniedrigende Wirkung bzw. die Wirksamkeit des Preßsaftes kontrollieren. Adrenalin wurde in Form des *Richter*schen Tonogens eingeführt, dessen 1 ccm 1 mg Adrenalin enthält.

---

1) *Fuchs* und *Roth*, ebendaselbst **10**, 1912; **14**, 1913.
2) *Hári*, diese Zeitschr. **38**, 23, 1912.
3) *Verzár* und *Fejér*, ebendaselbst **53**, 167, 1913.

Die Ergebnisse der Untersuchungen sind aus den Tabellen I bis XVI, alle Einzelheiten der Experimente betreffend, ohne weiteres ersichtlich. Die Mittelwerte der einzelnen Experimente sind der leichteren Übersicht halber in der Tabelle XVII zusammengefaßt, in welcher das Verhalten bzw. die Änderung des respiratorischen Quotienten unter der Einwirkung verschiedener Hormone bzw. bei kombinierter Anwendung derselben besonders auffällt.

Auf Grund unserer Untersuchungen können wir über die quantitativen Verhältnisse des Gaswechsels folgendes feststellen:

Nach Einspritzung des Pankreaspreßsaftes trat in fünf der sieben normalen Versuchsreihen eine Erhöhung des O_2-Verbrauches sowie der CO_2-Ausgabe ein, während in zwei Versuchsreihen (III und IV) diese Werte eine Abnahme zeigen. Die Tabellen XVIII und XIX enthalten diese Veränderungen im Vergleiche zu den Mittelwerten vor der Einspritzung bzw. in Prozenten derselben, und zwar separat von halber Stunde zu halber Stunde nach der Injektion. Die aus diesen Werten berechneten Mittelzahlen zeigen am normalen Hunde eine Zunahme des O_2-Verbrauches um 6 bis 14%, der CO_2-Ausgabe um 7 bis 15%, wobei das Maximum in die zweite halbe Stunde nach der Einspritzung fällt.

Nach Einspritzung des Pankreaspreßsaftes an pankreasexstirpierten Hunden (Tabelle XI, XII, XIII) fand in zwei Fällen eine kleinere Erhöhung, in einem Falle eine mäßige Erniedrigung des O_2-Verbrauches und der CO_2-Produktion statt. Nach den Tabellen XX und XXI zeigte der O_2-Verbrauch in der ersten halben Stunde eine Zunahme von 4,6%, in der zweiten von 2,7%, in der dritten eine Abnahme von 3,2%; während derselben Zeit wurde in der CO_2-Ausgabe eine Zunahme von 3,5 bzw. 9,4%, später eine Abnahme von 2,3% beobachtet.

Tabellen VIII, IX und X zeigen die Wirkung des Adrenalins am pankreasexstirpierten Hunde. Hier sind die Ergebnisse auch nicht gleichsinnig, da die Mittelzahlen in der einen Versuchsreihe Erhöhung, in der zweiten eine stärkere, in der dritten eine mäßige Abnahme zeigen, den O_2-Verbrauch und die CO_2-Ausgabe betreffend. Nach den Tabellen XX und XXI nahm der O_2-Verbrauch in der ersten halben Stunde nach der Einspritzung des Adrenalins um 1% zu, in der zweiten und dritten um 5,6 bzw. 2,3% ab, während derselben Zeit zeigt die CO_2-Ausgabe eine Zunahme von 18,8% bzw. eine Abnahme von 1 und 2% gegenüber den normalen Werten.

Tabellen XIV, XV und XVI zeigen die gleichzeitige Wirkung von Adrenalin und Pankreaspreßsaft am pankreasexstirpierten Hunde. Der O_2-Verbrauch und die CO_2-Ausgabe wurden nach der ersten Einspritzung mäßig erhöht, die zweite und dritte Einspritzung aber wurden von einer mäßigen Abnahme der Mittelzahlen gefolgt.

Nach alledem vollziehen sich gewisse quantitative Veränderungen im Gaswechsel. Am normalen Tiere ist im allgemeinen eine erhöhende Wirkung des Pankreaspreßsaftes festzustellen. Diese Veränderung stellt eine gegensätzliche Wirkung dar gegenüber der des Adrenalins, wie es von *Hári*[1]) festgestellt wurde. Er fand nämlich bei Hunden nach Adrenalineinspritzung eine Abnahme des O_2-Verbrauches um um 9 bis 13 %, während sich nach Einspritzung von Pankreaspreßsaft, wie bereits oben festgestellt wurde, eine Zunahme von 5 bis 11 % zeigt.

Die an pankreasexstirpierten Hunden ausgeführten Versuche erlauben keine sicheren Schlüsse die quantitativen Verhältnisse des Gaswechsels betreffend, da die einzelnen Gruppen von Versuchsreihen zu klein sind. Man gewinnt aber aus den Versuchen den Eindruck, daß der O_2-Verbrauch am pankreasexstirpierten Hunde durch Adrenalin eher erniedrigt, durch Pankreashormon eher erhöht wird. Was die gleichzeitige Verabfolgung beider Hormone betrifft, waren wir nicht in der Lage, physiologisch äquivalente Mengen zu verwenden, da der innersekretorische Hormon des Pankreas isoliert bis jetzt noch nicht bekannt ist; bei den angewendeten Mengen (1 ccm Tonogen und 10 ccm Pankreaspreßsaft) schien sich die Gleichgewichtslage in der spezifischen Richtung des Pankreas verschoben zu haben, mindestens am pankreasexstirpierten Hunde, da die registrierten Pulskurven dem Pankreaspulse entsprachen; außerdem wurden in den Versuchen XIV und XV die nach wiederholter Zufuhr zu beobachtende Erhöhung des Respirationsquotienten und die Steigerung des Gaswechsels beobachtet (O_2 um 3 bis 8,6 %, CO_2 um 4,4 bis 11 %).

Die qualitativen Verhältnisse des Gaswechsels betreffend konnten wir folgendes feststellen: Es ist vor allem auffallend, daß der Gaswechsel von pankreasexstirpierten Hunden im Vergleich zum normalen qualitativ verändert ist, da der respiratorische Quotient nach 24stündigem Hungern niedriger ausfällt als beim normalen Tiere. Derselbe beträgt nämlich im Mittel von sieben Versuchen 0,81, beim pankreasdiabetischen Tiere im Mittel von neun Versuchen 0,71. Dieser Befund entspricht der Feststellung von *Verzár*[2]) an pankreasexstirpierten Hunden, welche er so erklärt, daß nach Exstirpation des Pankreas eine Substanz verschwindet, welche den respiratorischen Quotienten des normalen Tieres in der Höhe hält bzw. welche die Verbrennung der Kohlehydrate regelt.

Der respiratorische Quotient zeigte folgende Veränderungen. Am normalen Tiere trat nach der Einspritzung von Pankreaspreßsaft eine geringere Erhöhung ein. In den Mittelzahlen der Respirationsquotienten-

---

[1]) *Hári*, l. c.

[2]) *Verzár*, diese Zeitschr. 44, 201, 1912.

mittelwerte vor und nach der Einspritzung ausgedrückt, steigt der Respirationsquotient von 0,81 auf 0,84 (sieben Versuche). In vier Versuchsreihen konnten wir auch eine zweite Einspritzung vornehmen. In zwei Fällen (IV u. VI) beobachteten wir eine stärkere Erhöhung, in den anderen zwei Fällen eine geringere Abnahme des respiratorischen Quotienten.

Am pankreasdiabetischen Hunde verfügen wir über drei Versuchsreihen mit Pankreaspreßsaft. Nach der ersten Einspritzung änderte sich der respiratorische Quotient gar nicht bzw. in einem Falle ganz unwesentlich. Nach der zweiten Einspritzung stieg der respiratorische Quotient in beiden Fällen an (0,77 bis 0,93, 0,71 bis 0,78). Drei pankreasdiabetische Hunde erhielten Adrenalin. In sämtlichen drei Fällen stieg der respiratorische Quotient beträchtlich an, dieser Anstieg konnte in zwei Fällen bei der zweiten und dritten Adrenalineinspritzung nicht beobachtet werden, in einem Falle wurde es aber sogar übertroffen (IX).

In den letzten drei Versuchsreihen erhielten pankreasdiabetische Hunde gleichzeitig 10 ccm Pankreaspreßsaft und 1 ccm Adrenalin. Nach der ersten Einspritzung fand in keiner Versuchsreihe eine Veränderung statt. Nach der in zwei Fällen wiederholten zweiten Einspritzung wurde in einem Falle eine minimale, im anderen eine beträchtlichere Erhöhung beobachtet (0,74 bis 0,81).

Wie ersichtlich, verändert die Einspritzung des Pankreaspreßsaftes auch qualitativ den Stoffwechsel, indem der respiratorische Quotient ansteigt. Diese Tatsache entspricht der oben erwähnten, zuerst von *Verzár* gefundenen und durch uns bekräftigten Beobachtung, daß nämlich der respiratorische Quotient nach Ausfall des Pankreashormons niedriger wird; sie steht scheinbar im Gegensatz zu der Beobachtung von *Verzár* und *Fejér*[1]), denen der Nachweis der Verbrennung von eingeführter Dextrose weder nach der In- bzw. Transfusion arteriellen oder Pankreasvenenblutes, noch nach der Anwendung des nach *Knowlton* und *Starling* zubereiteten Pankreashormons gelang. Es ist aber in Betracht zu nehmen, daß die Konzentration des Pankreashormons wie der innersekretorischen Produkte im allgemeinen im Blute, sogar im Pankreasvenenblute nicht groß sein kann, und wird der Zuckerstoffwechsel nur durch seine fortwährende Wirkung beeinflußt; auf diese Weise wird die Unwirksamkeit des eingeführten, einem fremden Tiere entstammenden Blutes erklärlich. Die Unwirksamkeit des „Pankreashormons" ist vielleicht darauf zurückzuführen, daß das von *Knowlton* und *Starling* vorgeschriebene Kochen in saurem Medium das Hormon leichter schädlich beeinflußt als die von uns benutzte einfache Auspressung. Spuren der Wirkung zeigten sich aber auch in den Versuchen von *Verzár* und *Fejér*[1]), da der respiratorische

[1]) *Verzár* und *Fejér*, diese Zeitschr. **58**, 1913.

Quotient nach der Einführung der im Hormonauszuge gegebenen Dextrose im Vergleich zu dem vorausgehenden Versuche wesentlich (0,07 bis 0,10), obzwar kurz anhaltend, anstieg.

Besonderes Interesse verdienen jene Versuchsreihen, in welchen pankreasdiabetischen Hunden Adrenalin eingespritzt wurde. Nach der Einspritzung erfolgte eine starke Erhöhung des respiratorischen Quotienten, welche auf die Verbrennung von Zucker zu schließen erlaubt. Zucker wird daher auch bei vollkommenem Fehlen des Pankreas verbrannt, d. h. die durch Adrenalin verursachte Zuckermobilisation wird auch ohne Anwesenheit des Pankreashormons von Zuckerverbrennung gefolgt. Die kleine Anzahl der Versuche erlaubt zwar keine allgemeine Folgerung, da dieselben nicht vollkommen gleichsinnig sind (z. B. stieg der respiratorische Quotient im Versuche VIII nur nach der ersten Verabfolgung an, im Versuche IX folgte der wiederholten Einführung ein allmählicher Anstieg des respiratorischen Quotienten); wir finden aber mindestens im Versuche VIII ein analoges Verhalten zu den Untersuchungen von *Fuchs* und *Roth*[1]) an Diabetikern mit Adrenalin. Es stieg nämlich der respiratorische Quotient bei je einem unter vier Fällen am ersten Tage der Adrenalinanwendung in der ersten, d. h. unter direkter Adrenalinwirkung stehenden Periode beträchtlich bzw. mäßig an, in einem Falle wurde nach jeder einzelnen Adrenalinanwendung ein ähnliches Verhalten festgestellt. Die Ätiologie des menschlichen Diabetes ist nicht einheitlich, andererseits konnten in unseren Versuchen akzessorische Pankreasteile eine Rolle spielen, wir wollen daher keine weiteren Schlüsse ziehen, scheinbar wird aber die zuckerverbrennende Fähigkeit des diabetischen Organismus, wenn sie auch da ist, bald erschöpft.

Unsere Ergebnisse fassen wir in folgendem zusammen:

1. Einspritzung von Pankreaspreßsaft erhöht den Gaswechsel, da derselbe ein Anstieg des O_2-Verbrauches und der CO_2-Produktion folgt. Der wirksame Bestandteil des Pankreaspreßsaftes entwickelt daher eine dem Adrenalin entgegengesetzte Wirkung auf den Gaswechsel, welcher durch Adrenalin erniedrigt, durch Pankreashormon erhöht wird.

2. Die Einspritzung von Pankreaspreßsaft hat auch eine qualitative Wirkung auf den Stoffwechsel, da der respiratorische Quotient erhöht wird. Diese Wirkung des Pankreashormons entspricht derjenigen des Adrenalins, nach dessen Einführung in den Organismus der respiratorische Quotient ebenfalls erhöht wird (*Fuchs-Roth, Hári*), diese Erhöhung ist aber nie so hochgradig wie die sich unter Adrenalinwirkung einstellende Erhöhung.

---

[1]) *Fuchs* und *Roth*, l. c.

Tabelle I.

Versuchstier 1. Körpergewicht 12000 g. Datum 6. Februar 1912.

Nummer des Versuches	Anfang des Versuches	Dauer des Versuches	Ventilation pro Minute ccm	O_2-Abnahme in der Ventilationsluft %	CO_2-Zunahme in der Ventilationsluft %	O_2-Verbrauch pro Minute ccm	CO_2-Ausgabe pro Minute ccm	$\frac{CO_2}{O_2}$	Körpertemperatur am Anfang u. Ende des Versuches °C	Anmerkungen
1	11h 52′	7′ 55″	4030	1,911	1,623	77,15	65,5	0,849	38,9 38,9	
2	12 08	8 24	3825	1,853	1,603	71,3	61,7	0,865	38,9 38,9	
3	12 35	9 20	3742	2,282	1,943	86,5	73,5	0,851	38,1 38,1	
4	12 47	11 12	3585	2,327	1,892	83,5	67,85	0,813	38,1 38,2	
5	1 08	9 10	3710	2,333	1,858	86,5	68,9	0,796	38,2 38,5	
6	1 40	11 02	3665	2,425	2,017	88,85	73,8	0,832	39,8 40,1	1h 30′ 10 ccm Pankreaspreßsaft intravenös
7	2 08	11 10	3700	2,556	2,143	94,5	79,5	0,838	40,2 40,1	
8	2 30	11 08	3735	2,677	2,293	99,8	85,5	0,856	40,1 40,1	
9	2 55	11 00	3589	2,683	2,076	96,5	74,5	0,774	40,1 40,0	

Tabelle II.

Versuchstier 2. Körpergewicht 4200 g. Datum 9. Februar 1912.

Nummer des Versuches	Anfang des Versuches	Dauer des Versuches	Ventilation pro Minute ccm	O_2-Abnahme in der Ventilationsluft %	CO_2-Zunahme in der Ventilationsluft %	O_2-Verbrauch pro Minute ccm	CO_2-Ausgabe pro Minute ccm	$\frac{CO_2}{O_2}$	Körpertemperatur am Anfang u. Ende des Versuches °C	Anmerkungen
1	11h 48′	19′ 49″	1752	1,888	1,630	33,05	28,55	0,863	36,2 36,5	
2	12 18	13 25	1709	1,929	1,593	32,95	27,20	0,826	— 37	
3	12 44	14 04	1729	1,898	1,741	28,46	26,15	0,917	37,3 37,9	
4	1 14	16 00	2272	2,104	1,818	36,40	31,40	0,864	37,2 38,4	
5	1 39	16 54	1676	1,926	1,658	32,27	27,80	0,861	38,5 38,4	
6	2 20	13 47	1705	2,092	1,801	35,65	30,72	0,861	38,3 —	2h 08′ 10 ccm Pankreaspreßsaft intravenös
7	2 40	16 43	2375	2,058	1,937	47,7	46,00	0,941	38,0 38,0	
8	3 08	16 33	1732	2,121	1,826	36,78	31,60	0,859	38,1 38,5	
9	3 24	15 12	1685	2,153	2,122	36,25	35,80	0,986	39,0 39,0	
10	4 04	15 38	1662	2,359	2,132	38,45	34,78	0,904	39,0 38,9	3h 45′ 10 ccm Pankreaspreßsaft intravenös
11	4 24	24 10	1707	2,543	2,051	43,45	34,25	0,807	38,9 38,6	
12	4 57	15 24	1519	2,221	1,861	33,75	28,25	0,838	38,5 38,2	

Tabelle III. Versuchstier 5. Körpergewicht 8000 g. Datum 19. März 1912.

Nummer des Versuches	Anfang des Versuches	Dauer des Versuches	Ventilation pro Minute ccm	O_2-Abnahme in der Ventilationsluft %	CO_2-Zunahme in der Ventilationsluft %	O_2-Verbrauch pro Minute ccm	CO_2-Ausgabe pro Minute ccm	$\frac{CO_2}{O_2}$	Körpertemperatur am Anfang u. Ende des Versuches °C	Anmerkungen
1	12h20′	9′43″	1840	2,895	2,224	53,0	41,0	0,768	38,1 38,5	
2	12 37	11 38	2033	2,836	2,271	57,6	46,15	0,802	38,0 38,0	
3	1 00	14 08	1930	2,89	2,27	55,1	43,2	0,785	38,1 38,3	
4	1 36	9 27	1765	3,138	2,371	55,2	41,7	0,755	38,4 38,4	
5	1 58	12 46	1737	2,932	2,159	50,9	37,5	0,736	38,1 38,2	1h 50′ 10 ccm Pankreaspreßsaft intravenös
6	2 16	12 09	1780	3,221	2,611	57,4	46,5	0,810	38,1 38,1	
7	2 40	14 01	1576	2,921	2,688	46,1	42,4	0,902	38,0 38,0	
8	3 00	12 38	1482	3,176	2,601	47,05	38,6	0,819	38,2 38,4	

Tabelle IV. Versuchstier 6. Körpergewicht 7000 g. Datum 24. April 1912.

Nummer des Versuches	Anfang des Versuches	Dauer des Versuches	Ventilation pro Minute ccm	O_2-Abnahme in der Ventilationsluft %	CO_2-Zunahme in der Ventilationsluft %	O_2-Verbrauch pro Minute ccm	CO_2-Ausgabe pro Minute ccm	$\frac{CO_2}{O_2}$	Körpertemperatur am Anfang u. Ende des Versuches °C	Anmerkungen
1	11h23′	8′47″	2415	2,689	2,236	65,0	54,0	0,831	37,8 37,8	
2	11 43	9 17	2292	3,001	2,321	68,75	53,2	0,773	37,8 37,6	
3	12 07	9 28	2363	2,622	2,020	62,1	47,8	0,770	37,5 —	
4	12 23	8 48	2349	2,956	2,228	69,2	52,2	0,754	37,6 —	
5	12 46	9 14	2342	2,380	2,057	55,7	48,1	0,864	37,8 37,9	12h 40′ 10 ccm Pankreaspreßsaft intravenös
6	12 59	10 19	2272	3,001	2,242	68,2	51,0	0,746	37,9 37,9	
7	1 20	9 54	2193	3,106	2,348	68,0	51,5	0,756	37,8 37,7	
8	1 55	14 07	2132	3,009	2,344	64,3	50,0	0,779	37,6 37,6	
9	2 25	12 03	2069	2,821	2,566	58,3	53,0	0,909	37,6 —	
10	3 05	13 33	2250	2,417	1,932	54,4	43,5	0,799	36,8 36,5	2h 55′ 10 ccm Pankreaspreßsaft intravenös
11	3 30	11 24	2200	2,556	2,303	56,3	50,75	0,921	36,3 36,3	

Tabelle V.

Versuchstier 7. Körpergewicht 5000 g. Datum 2. Mai 1912.

Nummer des Versuches	Anfang des Versuches	Dauer des Versuches	Ventilation pro Minute ccm	O_2-Abnahme in der Ventilationsluft %	CO_2-Zunahme in der Ventilationsluft %	O_2-Verbrauch pro Minute ccm	CO_2-Ausgabe pro Minute ccm	$\frac{CO_2}{O_2}$	Körpertemperatur am Anfang u. Ende des Versuches °C	Anmerkungen
1	11h37'	13'03"	1540	2,394	1,830	36,8	28,2	0,76	36,0 36,0	
2	11 56	14 53	1532	2,349	1,890	36,0	28,95	0,80	36,0 36,4	
3	12 19	14 55	1625	2,413	1,950	39,2	31,7	0,81	36,8 37,0	
4	1 04	12 51	1593	2,502	2,080	39,9	33,2	0,83	37,6 37,5	12h 58' 10 ccm Pankreaspreßsaft intravenös
5	1 22	16 25	1506	2,527	1,996	38,1	30,07	0,79	37,4 37,5	
6	1 42	16 51	1520	2,553	2,002	38,8	30,4	0,78	37,3 37,3	

Tabelle VI.

Versuchstier 8. Körpergewicht 6000 g. Datum 7. Mai 1912.

Nummer des Versuches	Anfang des Versuches	Dauer des Versuches	Ventilation pro Minute ccm	O_2-Abnahme in der Ventilationsluft %	CO_2-Zunahme in der Ventilationsluft %	O_2-Verbrauch pro Minute ccm	CO_2-Ausgabe pro Minute ccm	$\frac{CO_2}{O_2}$	Körpertemperatur am Anfang u. Ende des Versuches °C	Anmerkungen
1	12h 19'	10'52"	2345	2,265	1,706	53,2	40,0	0,753	37,2 37,4	
2	12 39	10 17	2394	2,139	1,802	51,2	43,15	0,842	37,6 37,7	
3	1 05	10 17	2441	2,143	1,721	52,3	42,1	0,803	38,0 37,8	
4	1 30	12 05	2430	2,137	1,633	51,95	39,7	0,764	38,2 38,5	
5	1 58	11 58	2248	2,636	2,060	59,25	46,3	0,781	38,1 —	1h 47' 10 ccm Pankreaspreßsaft intravenös
6	2 20	11 50	2272	2,568	2,338	58,3	53,1	0,910	38,5 38,5	
7	2 39	11 52	2319	2,666	2,095	61,8	48,5	0,785	38,2 38,2	
8	2 56	12 00	2388	2,464	2,065	58,8	49,3	0,838	38,0 38,2	
9	3 24	10 50	2350	2,226	1,982	50,0	46,6	0,890	38,2 38,0	3h 12' 6 ccm Pankreaspreßsaft intravenös
10	3 40	12 14	2393	2,250	1,913	53,8	45,8	0,850	38,2 38,1	
11	4 02	11 42	2345	2,104	1,945	49,4	45,6	0,924	38,0 —	

Tabelle VII.

Versuchstier 9. Körpergewicht 10000 g. Datum 11. Mai 1912.

Nummer des Versuches	Anfang des Versuches	Dauer des Versuches	Ventilation pro Minute ccm	O_2-Abnahme in der Ventilationsluft %	CO_2-Zunahme in der Ventilationsluft %	O_2-Verbrauch pro Minute ccm	CO_2-Ausgabe pro Minute ccm	$\frac{CO_2}{O_2}$	Körpertemperatur am Anfang u. Ende des Versuches °C	Anmerkungen
1	12h 06′	7′ 15″	3748	1,999	1,527	74,8	57,1	0,764	37,9 37,9	
2	12 20	6 45	3923	1,953	1,748	76,5	68,5	0,894	38,1 38,3	
3	12 46	6 18	3930	1,745	1,537	68,5	60,4	0,881	38,5 38,7	
4	12 58	7 17	4350	1,630	1,374	70,8	59,7	0,843	38,8 38,7	
5	1 34	8 34	4190	1,736	1,541	72,7	64,55	0,887	38,8 39,0	1h 21′ 10 ccm Pankreaspreßsaft intravenös
6	1 50	8 52	4160	1,832	1,763	76,3	73,4	0,963	39,0 39,0	
7	2 13	10 38	3920	1,932	1,667	75,75	65,4	0,863	39,0 39,0	
8	2 32	8 04	3930	2,047	1,692	80,5	66,5	0,826	39,1 39,2	
9	2 59	9 00	4410	1,777	1,519	78,35	67,0	0,854	38,8 38,7	2h 44′ 10 ccm Pankreaspreßsaft intravenös
10	3 13	8 01	3380	1,718	1,597	58,0	54,0	0,929	38,9 38,8	
11	3 30	9 54	4320	1,707	1,393	73,7	60,2	0,819	38,8 38,7	

Tabelle VIII.

Versuchstier 10. Pankreasexstirpation: 26. März 1913.
Versuch: 1. April 1913.

Nummer des Versuches	Anfang des Versuches	Dauer des Versuches	Ventilation pro Minute ccm	O_2-Abnahme in der Ventilationsluft %	CO_2-Zunahme in der Ventilationsluft %	O_2-Verbrauch pro Minute ccm	CO_2-Ausgabe pro Minute ccm	$\frac{CO_2}{O_2}$	Körpertemperatur am Anfang u. Ende des Versuches °C	Anmerkungen
1	12h 00′	15′ 54″	3219	2,346	1,526	75,9	49,1	0,650	37,0 37,1	
2	12 32	14 05	3326	2,236	1,312	77,4	43,6	0,587	37,3 37,8	
3	1 12	18 06	3353	2,487	2,094	83,4	70,2	0,842	38,0 38,5	1h 06′ 1 ccm Tonogen intravenös
4	1 46	15 30	3215	2,899	1,825	93,2	58,7	0,630	38,6 38,0	1h 37′ 1 ccm Tonogen intravenös
5	3 06	15 10	3310	3,171	2,093	105,0	69,3	0,660	39,3 39,3	3h 28′ 1 ccm Tonogen intravenös
6	3 33	14 39	3436	3,208	2,106	110,2	72,4	0,656	39,0 38,0	

Tabelle IX. Versuchstier 11. Pankreasexstirpation.

Nummer des Versuches	Anfang des Versuches	Dauer des Versuches	Ventilation pro Minute ccm	O_2-Abnahme in der Ventilationsluft %	CO_2-Zunahme in der Ventilationsluft %	O_2-Verbrauch pro Minute ccm	CO_2-Ausgabe pro Minute ccm	$\frac{CO_2}{O_2}$	Körpertemperatur am Anfang u. Ende des Versuches °C	Anmerkungen
1	9h 52′	10′09″	2804	3,340	2,439	93,7	68,4	0,728	39,4 39,5	
2	10 31	9 55	2783	3,407	2,306	94,8	64,2	0,677	39,8 39,9	
3	11 16	8 27	3378	3,292	1,974	111,2	66,7	0,597	40,1 40,1	
4	11 52	7 43	3517	3,576	2,022	125,8	71,1	0,565	40,2 40,2	
5	12 30	7 47	3593	2,881	2,060	103,5	74,0	0,715	40,3 40,3	
6	1 29	7 45	3599	2,799	2,053	100,8	73,9	0,733	40,5 40,3	1h 21′—23′ 1 ccm Tonogen intravenös
7	2 08	8 27	3577	2,693	1,901	96,3	68,0	0,706	40,2 40,2	
8	2 39	3 15	3610	2,863	1,853	103,4	67,0	0,647	40,1 40,4	
9	3 20	—	—	—	—	—	—	—	— —	
10	3 59	7 34	3662	2,386	1,693	87,4	61,9	0,709	40,3 40,2	
11	4 37	8 04	3572	2,332	1,758	84,4	62,8	0,754	40,2 40,1	4h 30′—33′ 1 ccm Tonogen intravenös
12	5 05	7 47	3161	2.328	1,693	73,6	52,9	0,727	40,0 40,0	
13	5 42	7 49	3562	2,423	1,998	86,3	71,1	0,824	40,2 40,3	5h 35′—37′ 1 ccm Tonogen intravenös
14	6 10	7 58	3495	2,402	—	84,0	—	—	40,4 40,4	

Tabelle X. Versuchstier 12. Körpergewicht 5000 g. Pankreasexstirpation: 14. Juni 1913. Versuch: 18. Juni 1913.

Nummer des Versuches	Anfang des Versuches	Dauer des Versuches	Ventilation pro Minute ccm	O_2-Abnahme in der Ventilationsluft %	CO_2-Zunahme in der Ventilationsluft %	O_2-Verbrauch pro Minute ccm	CO_2-Ausgabe pro Minute ccm	$\frac{CO_2}{O_2}$	Körpertemperatur am Anfang u. Ende des Versuches °C	Anmerkungen
1	1h 18′	8′55″	3221	2,110	1,699	68,0	54,7	0,805	39,0 39,5	
2	2 12	10 02	2700	2,624	2,044	70,8	55,2	0,779	40,0 40,0	
3	2 38	8 56	3011	2,490	2,004	75,0	60,3	0,805	40,0 40,0	
4	3 25	10 07	2710	2,652	2,067	71,9	56,0	0,779	40,0 40,0	3h 15′—18′ 1 ccm Tonogen intravenös
5	3 54	10 20	2800	2,488	2,002	69,7	56,0	0,805	40,3 40,5	

Tabelle XI. Versuchstier 13. Körpergewicht 7000 g. Pankreasexstirpation: 14. Juli 1913. Versuch: 18. Juli 1913.

Nummer (des Versuches)	Anfang (des Versuches)	Dauer (des Versuches)	Ventilation pro Minute ccm	O_2-Abnahme in der Ventilationsluft %	CO_2-Zunahme in der Ventilationsluft %	O_2-Verbrauch pro Minute ccm	CO_2-Ausgabe pro Minute ccm	$\frac{CO_2}{O_2}$	Körpertemperatur am Anfang u. Ende des Versuches °C	Anmerkungen
1	3h 42′	15′ 22″	1742	3,108	2,311	54,1	40,2	0,743	37,8 38,0	
2	4 05	16 00	1664	3,380	2,372	55,2	39,5	0,702	38,0 38,0	
3	6 05	15 52	1680	3,321	2,338	55,8	39,3	0,704	38,8 38,8	
4	6 35	19 04	1478	3,524	2,525	52,1	37,3	0,716	38,8 38,0	
5	7 30	20 00	1379	3,990	2,813	55,0	38,8	0,705	38,0 38,3	7h 20′ 10 ccm Pankreaspreßsaft intravenös
6	8 06	17 58	1486	3,822	2,768	56,8	41,1	0,724	38,5 38,8	
7	8 43	17 05	1498	3,665	2,586	54,9	38,7	0,705	38,9 38,8	
8	9 15	17 13	1569	3,472	2,438	54,5	38,2	0,702	38,8 38,6	
9	9 57	16 35	1608	3,192	2,320	51,2	37,3	0,727	38,7 38,4	
10	10 46	16 03	1729	2,878	2,075	49,7	35,9	0,721	38,8 38,8	
11	11 18	13 32	1956	1,737	1,455	34,0	28,5	0,838	38,9 38,9	

Tabelle XII. Versuchstier 15. Körpergewicht 5000 g. Pankreasexstirpation: 6. November 1913. Versuch: 11. November 1913.

Nummer	Anfang	Dauer	Ventilation pro Minute ccm	O_2-Abnahme %	CO_2-Zunahme %	O_2-Verbrauch ccm	CO_2-Ausgabe ccm	$\frac{CO_2}{O_2}$	Körpertemperatur °C	Anmerkungen
1	6h 30′	9′ 11″	3023	2,186	1,513	66,1	45,7	0,692	39,7 39,8	
2	6 56	9 15	3137	2,022	1,436	63,4	45,1	0,710	40,0 40,0	
3	7 22	8 46	3183	2,003	1,437	63,7	45,7	0,717	40,0 40,0	
4	7 54	8 39	3231	2,114	1,502	68,3	48,5	0,710	40,0 39,9	7h 50′ 10 ccm Pankreaspreßsaft intravenös
5	8 05	10 18	3225	2,227	1,644	71,8	53,0	0,738	39,9 40,0	
6	8 32	8 32	3338	2,022	1,522	67,5	50,8	0,753	40,0 —	
7	8 58	10 14	2713	2,269	1,557	61,6	42,2	0,686	38,8 —	
8	9 32	10 59	2580	1,917	1,493	49,5	38,5	0,779	40,0 —	9h 26′ 10 ccm Pankreaspreßsaft intravenös
9	9 46	11 33	2536	2,283	1,775	57,9	45,0	0,777	40,0 39,9	
10	10 15	9 52	2729	2,185	1,735	59,6	47,3	0,794	39,9 39,9	
11	10 40	10 38	2757	2,132	1,640	58,8	45,2	0,769	40,0 40,0	

Tabelle XIII.

Versuchstier 14. Körpergewicht 8000 g. Pankreasexstirpation: 11. November 1913. Versuch: 16. November 1913.

Nummer (des Versuches)	Anfang (des Versuches)	Dauer (des Versuches)	Ventilation pro Minute ccm	O_2-Abnahme in der Ventilationsluft %	CO_2-Zunahme in der Ventilationsluft %	O_2-Verbrauch pro Minute ccm	CO_2-Ausgabe pro Minute ccm	$\frac{CO_2}{O_2}$	Körpertemperatur am Anfang u. Ende des Versuches °C	Anmerkungen
1	6h 04′	5′ 26″	5121	1,424	1,184	72,9	60,6	0,833	39,0 39,2	
2	6 21	5 34	5100	1,532	1,265	78,1	64,5	0,826	39,8 39,4	
3	6 42	5 20	5191	1,771	1,263	91,9	65,6	0,713	39,8 39,9	
4	7 05	5 25	5161	1,705	1,220	88,0	63,0	0,715	40,0 40,0	
5	7 42	5 32	5213	1,708	1,181	89,0	61,5	0,691	40,3 39,8	7h 36′ 10 ccm Pankreaspreßsaft intravenös
6	7 50	5 55	5116	1,897	1,320	97,0	67,5	0,696	40,8 40,9	
7	8 15	5 13	5188	1,708	1,385	88,6	71,9	0,811	40,8 40,9	
8	8 45	5 33	5028	1,743	1,318	87,6	66,3	0,756	41,2 41,3	
9	9 10	5 55	4905	1,329	1,106	65,2	54,2	0,832	41,7 41,8	9h 06′ 10 ccm Pankreaspreßsaft intravenös
10	9 19	6 10	4943	1,783	1,354	88,2	66,9	0,759	41,8 41,9	
11	9 40	5 38	5008	—	—	—	—	—	41,9 —	
12	10 07	5 22	5571	1,332	1,132	75,2	63,0	0,850	42,1 41,8	

Tabelle XIV.

Versuchstier 16. Körpergewicht 10500 g. Pankreasexstirpation: 10. Februar 1914. Versuch: 15. Februar 1914.

1	10h 58′	11 43	2187	3,378	2,487	73,9	54,4	0,736	—	
2	11 19	11 48	2214	3,278	2,408	72,6	53,3	0,734	—	
3	11 43	12 28	2133	3,425	2,504	73,1	53,4	0,731	—	
4	12 28	11 40	2313	3,104	2,329	71,8	53,9	0,750	—	12h 22′ bis 24′ 10 ccm Pankreaspreßsaft + 1 ccm Tonogen intravenös
5	12 53	12 46	2057	3,956	2,814	81,4	57,9	0,711	—	
6	1 25	11 58	2232	3,594	2,576	80,2	57,5	0,718	—	
7	1 58	12 39	2058	3,524	2,544	72,5	52,3	0,722	—	
8	2 25	12 40	2104	3,376	2,548	71,1	53,6	0,755	—	
9	2 58	12 46	2094	3,383	2,517	70,9	52,7	0,744	—	
10	4 00	14 46	1904	2,566	2,849	48,8	54,2	1,110	—	3h 50′ 1 ccm Tonogen, 3h 53′ 10 ccm Pankreaspreßsaft, 3h 55′ 0,3 ccm Tonogen intravenös
11	4 30	14 43	1789	4,424	3,125	79,2	55,9	0,706	—	
12	5 01	16 34	1773	4,521	3,278	78,3	58,1	0,725	—	
13	—	14 28	1951	3,987	3,156	77,8	61,6	0,791	—	
14	6 10	13 18	2095	3,801	2,932	79,6	61,4	0,771	—	
15	—	13 47	—	3,596	2,671	—	—	0,743	—	

Tabelle XV. Versuchstier 17. Pankreasexstirpation: 10. Mai 1914. Versuch: 15. Mai 1914.

Nummer	Anfang	Dauer	Ventilation pro Minute	O_2-Abnahme	CO_2-Zunahme	O_2-Verbrauch	CO_2-Ausgabe	$\frac{CO_2}{O_2}$	Körpertemperatur am Anfang u. Ende des Versuches	Anmerkungen
des Versuches				in der Ventilationsluft		pro Minute				
			ccm	%	%	ccm	ccm		°C	
1	7h23'	11'03"	2420	3,301	2,514	79,9	60,8	0,762	38,8 38,8	
2	7 45	10 36	2358	3,328	2,491	78,5	58,7	0,748	39,0 39,0	
3	8 10	12 02	2255	3,349	2,411	75,5	54,4	0,720	39,0 39,0	
4	9 02	13 48	2173	3,772	2,581	81,9	56,1	0,684	39,0 39,0	8h55'—57' 10 ccm Pankreaspreßsaft + 1 ccm Tonogen intravenös
5	9 41	12 11	2215	3,742	2,885	82,9	63,9	0,771	39,2 39,0	
6	10 10	11 37	2263	3,670	2,887	83,0	65,4	0,787	39,0 39,0	
7	10 38	12 20	2150	3,718	2,851	79,8	61,2	0,767	39,1 39,1	
8	11 17	12 03	2132	3,538	2,761	75,4	56,7	0,780	39,1 39,3	11h12'—15' 7 ccm Pankreaspreßsaft + 1 ccm Tonogen intravenös
9	—	11 48	2218	3,716	3,075	82,4	68,1	0,827	39,7 39,7	
10	—	12 22	2300	3,467	2,852	79,8	66,0	0,822	39,5 39,4	
11	—	11 36	2388	3,319	2,655	79,1	63,3	0,800	39,4 39,4	
12	—	11 52	2205	3,035	2,463	66,8	54,3	0,811	39,2 —	10 ccm Pankreaspreßsaft + 1 ccm Tonogen intravenös

Tabelle XVI. Versuchstier 18. Körpergewicht 13500 g. Pankreasexstirpation: 31. Mai 1914. Versuch: 4. Juni 1914.

Nummer	Anfang	Dauer	Ventilation pro Minute	O_2-Abnahme	CO_2-Zunahme	O_2-Verbrauch	CO_2-Ausgabe	$\frac{CO_2}{O_2}$	Körpertemperatur am Anfang u. Ende des Versuches	Anmerkungen
des Versuches				in der Ventilationsluft		pro Minute				
			ccm	%	%	ccm	ccm		°C	
1	7h29'	15'58"	2885	2,354	1,774	67,9	51,2	0,754	39,2 39,3	
2	7 55	16 48	2812	2,387	1,756	67,1	49,4	0,736	39,3 39,4	
3	8 33	17 58	2795	2,454	1,810	68,6	50,6	0,738	39,6 39,7	
4	9 16	16 57	2679	2,816	2,145	75,4	57,5	0,762	40,0 40,0	9h12'—13' 10 ccm Pankreaspreßsaft + 1 ccm Tonogen intravenös
5	9 54	18 44	2628	2,938	2,137	77,2	56,2	0,727	40,0 40,0	
6	10 37	17 31	2556	2,891	2,123	73,9	54,3	0,734	40,0 40,0	

Tabelle XVII.

Versuchsreihe	Nr. des Versuches	O Verbrauchsangabe pro Minute ccm	CO_2 Verbrauchsangabe pro Minute ccm	$\frac{CO_2}{O_2}$	Anmerkung
1	1—5	81,0	67,5	0,84	10 ccm Pankreas
	6—9	94,9	78,4	0,83	
2	1—5	82,6	28,2	0,87	10 „ „
	6—9	39,1	36,0	0,91	10 „ „
	10—12	38,6	32,4	0,85	
3	1—4	55,2	48,0	0,78	10 „ „
	5—8	50,3	41,2	0,82	
4	1—4	66,2	51,8	0,78	10 „ „
	5—9	62,9	50,7	0,81	10 „ „
	10—11	55,3	47,1	0,86	
5	1—3	37,8	29,6	0,79	10 „ „
	4—6	38,9	31,22	0,80	
6	1—4	52,2	41,2	0,79	10 „ „
	5—8	59,5	49,3	0,83	6 „ „
	9—11	51,1	46,0	0,89	
7	1—4	72,4	61,4	0,85	10 „ „
	5—8	76,3	67,5	0,88	10 „ „
	9—11	70,0	60,4	0,87	
8	1—2	76,6	46,8	0,62	1 ccm Adrenalin
	3	83,4	70,2	0,84	1 „ „
	4—5	99,1	63,5	0,65	1 „ „
	6	110,2	72,4	0,66	
9	1—5	105,8	68,9	0,66	1 „ „
	6—10	99,5	67,7	0,70	1 „ „
	11—12	79,0	57,8	0,74	1 „ „
	13	86,3	71,1	0,82	
10	1—3	71,8	56,7	0,80	1 „ „
	4—5	70,3	56,0	0,79	
11	1—4	54,3	39,1	0,72	10 ccm Pankreas
	5—11	50,4	36,9	0,73	
12	1—3	64,4	45,5	0,71	10 „ „
	4—7	67,3	48,6	0,71	10 „ „
	8—11	56,4	44,0	0,78	
13	1—4	82,7	63,4	0,77	10 „ „
	5—8	90,6	66,8	0,74	10 „ „
	9—12	76,2	61,4	0,83	
14	1—3	73,2	52,7	0,73	10ccm Pankr. + 1 ccm Adr.
	4—9	74,9	54,9	0,73	10 „ „ + 1,3 „ „
	10—15	72,7	57,4	0,81	
15	1—3	78,0	58,0	0,74	10ccm Pankr. + 1 ccm Adr.
	4—7	81,9	61,6	0,75	10 „ „ + 1 „ „
	8—11	76,7	61,3	0,81	10 „ „ + 1 „ „
	12	66,8	54,3	0,81	
16	1—3	67,8	50,4	0,74	10 „ „ + 1 „ „
	4—6	75,5	56,0	0,74	

Tabelle XVIII. Versuche mit Pankreaspreßsaft an normalen Hunden.

Versuchsreihe	Veränderung des O_2-Verbrauches (ccm pro 1 Min).				der CO_2-Produktion (ccm pro 1 Min.)				des respiratorischen Quotienten			
	verglichen mit den Mittelwerten aus den Versuchen vor der Injektion innerhalb der											
	1.	2.	3.	4.	1.	2.	3.	4.	1.	2.	3.	4.
	halben Stunde nach der ersten Injektion											
1.	+ 7,8	+13,5	+18,8	+15,5	+ 6,3	+12,0	+18,0	+7,0	— 0,003	+ 0,003	+ 0,021	— 0,061
2.	+ 3,42	+15,47	+ 4,55	+ 4,02	+ 2,50	+17,78	+ 3,38	+7,58	— 0,005	+ 0,075	— 0,007	+ 0,120
3.	— 4,31	+ 1,74	— 1,96	— 7,96	— 2,25	— 0,3	— 0,8	+1,2	+ 0,023	— 0,026	— 0,003	+ 0,127
4.	+ 2,57	+ 1,12	—	—	+ 3,58	+ 0,69	—	—	+ 0,040	— 0,005	—	—
5.	+ 7,09	+ 7,89	+ 6,64	—	+ 5,06	+ 9,56	+ 8,06	—	— 0,0095	+ 0,0565	+ 0,0475	—
6.	+ 0,05	+ 3,37	+ 7,85	—	+ 3,13	+ 7,98	+ 5,08	—	+ 0,0415	+ 0,0675	— 0,0195	—
7.	+ 6,75	+ 4,77	+ 3,2	—	+ 2,84	+ 4,19	+ 6,04	—	— 0,088	— 0,045	+ 0,001	—
								Im Mittel	+ 0,000	+ 0,018	+ 0,008	—

Tabelle XIX. Versuche mit Pankreaspreßsaft an normalen Hunden.

Versuchsreihe	Veränderung des O_2-Verbrauches				der CO_2-Produktion			
	in Prozenten der Mittelwerte der Versuche vor der Injektion innerhalb der							
	1.	2.	3.	4.	1.	2.	3.	4.
	halben Stunde nach der ersten Injektion							
1.	+ 9,63	+16,68	+23,22	+ 19,13	+ 9,35	+17,8	+26,72	+10,38
2.	+10,6	+48,0	+14,22	+ 12,48	+ 8,85	+63,0	+11,97	+26,86
3.	— 6,31	+ 2,63	— 2,96	— 12,0	— 4,35	— 0,58	— 1,59	+ 2,32
4.	+ 6,9	+ 3,01	—	—	+12,08	— 2,32	—	—
5.	+13,6	+15,13	+12,73	—	+12,27	+23,19	+19,55	—
6.	+ 0,07	+ 4,65	+10,8	—	+ 5,1	+13,0	+ 8,3	—
7.	+13,0	+ 7,28	+ 4,88	—	+ 4,48	+ 6,62	+ 9,52	—
Im Mittel	+ 6,64	+13,91	+10,48		+ 6,82	+15,81	+12,41	

Tabelle XX. Versuche mit Adrenalin, Pankreaspreßsaft bzw. Adrenalin + Pankreaspreßsaft an pankreaslosen Hunden.

Versuchsreihe	Veränderung des O_2-Verbrauches (ccm pro 1 Minute)						der CO_2-Produktion (ccm pro 1 Minute)						des respiratorischen Quotienten						Anmerkung
	verglichen mit den Mittelwerten aus den Versuchen vor der Injektion innerhalb der																		
	1.	2.	3.	4.	5.	6.	1.	2.	3.	4.	5.	6.	1.	2.	3.	4.	5.	6.	
	halben Stunde nach der ersten Injektion																		
9.	+6,75	—	—	—	—	—	+23,85	—	—	—	—	—	+0,224	—	—	—	—	—	Adrenalin
10.	—5,0	—9,5	—2,4	—	—	—	+ 4,05	—0,85	—1,85	—	—	—	+0,077	+0,050	—0,009	—	—	—	
11.	+0,63	—1,57	—	—	—	—	— 0,7	—0,7	—	—	—	—	—0,017	+0,009	—	—	—	—	
												Im Mittel	+0,094	+0,029	—0,009	—	—	—	
12.	+0,7	+2,5	—	+0,6	+0,2	—3,1	— 0,3	+2,0	—	—0,4	—0,9	—1,8	—0,011	+0,008	—	—0,011	—0,014	+0,011	Pankreaspreßsaft
13.	+5,6	+3,1	—2,8	—	—	—	+ 5,2	+5,3	—3,3	—	—	—	+0,018	+0,047	—0,020	—	—	—	
14.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
												Im Mittel							
15.	—1,4	+8,2	+7,0	—0,7	—2,1	—2,3	+ 1,2	+5,2	+4,8	—0,4	+0,9	—	+0,016	—0,023	—0,016	—0,012	+0,021	+0,010	Pankreaspreßsaft + Adrenalin
16.	+3,9	+4,9	+5,0	+1,8	—	—	— 1,9	+5,9	+7,4	+3,2	—	—	—0,059	+0,028	+0,044	+0,024	—	—	
17.	+4,2	+6,0	—	+2,7	—	—	+ 7,1	+5,8	—	+3,9	—	—	+0,019	—0,016	—	—0,009	—	—	
												Im Mittel	—0,008	—0,004	+0,014	+0,001	—	—	

Tabelle XXI. Versuche mit Adrenalin, Pankreaspreßsaft bzw. Adrenalin + Pankreaspreßsaft an pankreaslosen Hunden.

Versuchsreihe	Veränderung des O_2-Verbrauches						der CO_2-Produktion						Anmerkung
	in Prozenten der Mittelwerte der Versuche vor der Injektion innerhalb der												
	1.	2.	3.	4.	5.	6.	1.	2.	3.	4.	5.	6.	
	halben Stunde nach der ersten Injektion												
8.	+ 8,81	—	—	—	—	—	+51,5	—	—	—	—	—	Adrenalin
9.	— 4,73	— 8,98	— 2,27	—	—	—	+ 5,88	— 1,23	— 2,69	—	—	—	
10.	— 0,88	— 2,22	—	—	—	—	— 0,98	— 0,98	—	—	—	—	
Im Mittel	+ 1,06	— 5,6	— 2,27	—	—	—	+18,8	— 1,11	— 2,69	—	—	—	
11.	+ 1,29	+ 4,61	—	+ 1,14	+ 0,37	— 5,72	— 0,77	+ 5,12	—	— 1,22	— 2,3	— 4,61	Pankreaspreßsaft
12.	+ 8,7	+ 4,82	— 4,35	—	—	—	+11,42	+11,64	— 7,26	—	—	—	
13.[1])	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
14.	— 1,91	+11,2	+ 9,56	— 0,96	— 2,87	— 3,15	+ 2,28	+ 9,87	+ 9,11	— 0,76	— 1,71	—	Pankreaspreßsaft + Adrenalin
15.	+ 5,01	+ 6,28	+ 6,42	+ 2,31	—	—	— 3,28	+10,35	+12,76	+ 5,53	—	—	
16.	+ 5,9	+ 8,44	—	+ 3,79	—	—	+14,1	+11,5	—	+ 7,75	—	—	
Im Mittel	+ 3,0	+ 8,64	+ 7,99	+ 1,71	—	—	+ 4,39	+ 10,57	+ 10,93	+ 4,17	—	—	

1) Infolge der beträchtlichen Differenzen zwischen den einzelnen Werten der Vorperiode wurde von der auf den Mittelwert bezogenen prozentuellen

Über den Chemismus der Atmungstetanie.

Von

P. György und H. Vollmer.

(Aus der Heidelberger Kinderklinik.)

(Eingegangen am 20. Juni 1923.)

Fortgesetzte vertiefte Atmung bei völliger Körperruhe erzeugt nervöse Störungen, deren tetanischer Charakter erst neuerdings, gleichzeitig, aber unabhängig voneinander von den amerikanischen Forschern *Collip-Backus* und *Grant* und *Goldmann* erkannt wurde, nachdem schon *Vernon* (1909) solche bei seinen Untersuchungen über Atmungsphysiologie beobachtet, aber nicht näher analysiert hatte. Im Anschluß an *Grant* und *Goldmann* teilten *Freudenberg* und *György*, *Frank*, *Porges* und *Adlersberg* ähnliche Befunde mit. Die klinische Bedeutung dieser sogenannten Atmungstetanie, als ein gewissermaßen selbständiges Krankheitsbild, wurde in der letzten Zeit von einer Anzahl Autoren betont (*Porges* und *Adlersberg*, *Goldmann*, *Barber* und *Sprunt*). Sowohl die experimentell an gesunden Individuen erzeugte künstliche Atmungstetanie, wie ihre im Laufe von verschiedenen Erkrankungen spontan auftretende Form, weisen nicht nur untereinander, sondern auch im Vergleich mit den anderen bekannten tetanischen Zuständen ein völlig gleiches Symptombild auf. Ihre Analyse dürfte mithin für das auch heute noch so umstrittene Wesen der Tetanie wertvolle Aufschlüsse liefern.

Behrendt und *Freudenberg* haben in einer ausgedehnten Untersuchungsreihe das Problem von einem mehr klinisch-neurologischen Standpunkt bearbeitet. Es gelang ihnen, den eindeutigen Beweis zu liefern, daß der Angriffspunkt der tetanischen Reize wohl nur zum Teil im Zentralnervensystem liegt, zu einem größeren Teil aber in peripheren Gebilden zu suchen ist. Als solche bezeichnen sie nach dem Ergebnis ihrer pharmakologischen Untersuchungen die rezeptive Substanz *Langleys;* nach *Höber*, auch Synapse genannt. Wenn wir nun daran erinnern, daß für die Wirkung des Ca nach *Höber* in erster Linie ebenfalls die Synapse in Betracht kommt, so scheint hierdurch eine Brücke zu der üblichen Auffassung über das Wesen der Tetanie

geschlagen zu sein, die in der tetanischen Nervenübererregbarkeit den Ausdruck eines Ca-Mangels erblickt.

Schon *Grant* und *Goldmann* brachten die Atmungstetanie mit einer Verarmung der Körpersäfte an Ca-Ionen in kausale Beziehung. Sie führen die Entionisierung des Ca auf die durch die forcierte Atmung entstandene Verschiebung der Blutreaktion gegen die alkalische Seite zu zurück. Die Überventilation bedingt zuerst eine starke Kohlensäureverarmung des Blutes. Der Quotient $\frac{H_2CO_3}{NaHCO_3}$, der mit der wahren Blutreaktion in direkter Proportion steht, nimmt durch den starken CO_2-Verlust ab: wir erhalten eine Blutalkalose. Im Bestreben, die normale wahre Reaktion aufrechtzuerhalten, versucht der Organismus, die besprochene Verschiebung im Werte des Quotienten durch eine vermehrte Ausscheidung bzw. Verdrängung von alkalischen Valenzen in die Gewebe wettzumachen. Diese ursprünglich von *Henderson* und *Hagard* geäußerte Ansicht konnte später durch *Leathes*, sowie *Haldane*, *Kellas* und *Kennaway*, *Collip* und *Backus*, neuerdings wiederum durch *Davies-Haldane* und *Kennaway*, wie auch durch *Grant* und *Goldmann* experimentell bestätigt werden. Ihre Untersuchungen lassen sich kurz in folgenden Sätzen zusammenfassen:

1. Forcierte Atmung bei Körperruhe führt als Ausdruck der CO_2-Verarmung zu einer Herabsetzung der alveolaren Kohlensäurespannung.
2. Die Blutreaktion weist alkalische Werte auf.
3. Die NH_3-Ausscheidung im Urin nimmt ab. *Davies-Haldane* und *Kennaway* konnten sogar ein völliges Verschwinden des Urin-NH_3 beobachten.
4. Die Urinreaktion verschiebt sich gegen die alkalische Seite zu.

Die im Laufe einer forcierten Atmung entstandene Alkalose äußerst sich mithin in alkalischen p_H-Werten im Blute und im Urin, wie auch in einer Abnahme des intermediär gebildeten Ammoniaks. Bei den bekannten Beziehungen der H-Ionenkonzentration zur Ca-Ionisation (*Rona-Takahashi*) dürfte eine wahre Alkalose tatsächlich zu einer Entionisierung des Ca und als Ausdruck davon zur Tetanie führen.

Für die Ionisation des Serum-Ca kommt nach *Rona-Takahashi* neben der H-Ionenkonzentration auch das Bicarbonatanion in Frage; sie stellen die bekannte Gleichung auf

$$\frac{Ca\,.\,HCO_3}{H} = \text{konst.}$$

Bei der Atmungstetanie erfolgt die Entionisierung durch eine Abnahme des Nenners.

Für eine ganze Reihe von den übrigen klinisch wichtigen Tetaniearten reicht aber die angegebene Formel nicht mehr aus. Hier wird

die Entionisierung des Ca durch das Phosphatanion bewirkt. Die *Rona-Takahashi*sche Formel dürfte nach *György* folgende Gestalt annehmen:

$$\frac{Ca \,.\, HCO_3 \,.\, HPO_4}{H} = \text{konst.},$$

wobei die primären Phosphate (H_2PO_4) noch im Nenner stehen müßten, wenn ihr saurer Charakter den Schluß nicht zulassen würde, sie durch die H-Ionenkonzentration (H) zu ersetzen. Diese Formel schließt sämtliche bis jetzt studierten und bekannten Möglichkeiten der Tetanie in sich ein. Sie mag vielleicht quantitativen Ansprüchen nicht völlig entsprechen (*Maiweg*), in gröberen Zügen dürfte sie die vorliegenden Verhältnisse tatsächlich wiedergeben.

Nach der angegebenen Formel dürfte man drei Tetaniearten voneinander unterscheiden.

1. Starke Zunahme von HCO_3.
2. Starke Zunahme von HPO_4.
3. Starke Abnahme von H.

Die Atmungstetanie gehört in die unter 3. bezeichnete Gruppe. Es liegt freilich auch die Möglichkeit vor, daß gleichzeitig mehrere von den bezeichneten Faktoren auf die Ca-Ionisation in der angegebenen Art einwirken.

Der Widerspruch, den diese Anschauungsweise in manchen Kreisen ausgelöst hat, stützt sich — insbesondere bei den Klinikern — auf die Tatsache, daß eben bei den klinisch wichtigen Tetanieformen (idiopathische, parathyreoprive) eine starke Erniedrigung des Gesamtserumkalkes verzeichnet wird. Sie sehen in diesem Befunde das Hauptcharakteristikum der Tetanie. Dagegen vertritt der eine von uns (*György*) den Standpunkt, daß die Abnahme des Gesamtserumkalkspiegels nur als Folge der gleichzeitig vorhandenen Phosphatstauung aufzufassen ist und von sekundärer Bedeutung sei. Eine Stütze für diese Auffassung erblickt er in den Versuchen von *Binger*, *Clark* und *Tisdall*, die nach Injektion von hohen Phosphatdosen — gleichgültig, ob Phosphorsäure, primäre oder sekundäre Phosphate — stets eine starke Erniedrigung des Gesamtserumkalkes, Tetanie aber nur nach Verabreichung von basischen Phosphaten nachweisen konnten.

Bei den Tetanieformen, die nicht auf eine Phosphatstauung zurückzuführen sind, dürfte eine Erniedrigung des Gesamtserumkalkes nicht zu beobachten sein. Das Phosphatanion begünstigt nach *Freudenberg* und *György* die Bindung des Ca an die Eiweißkörper, daher seine Ca verdrängende Wirkung. An Stelle des Calciums tritt Kalium, und wir können im Serum erhöhte Kaliumwerte nachweisen.

Grant und *Goldmann* berichten über einen normalen oder sogar leicht erhöhten Serumkalkspiegel bei der Atmungstetanie. Infolge der oben skizzierten Anschauungen ist demnach bei der Atmungstetanie für eine Phosphatstauung und Zunahme des Serumkaliums kein Platz. In der Literatur fehlen über diesen Punkt die Angaben. Hier mußten neue Untersuchungen einsetzen, über die wir in der vorliegenden Mitteilung berichten.

Wir zogen noch einen Punkt in den Kreis unserer Betrachtungen: Das Verhalten des Blutzuckers bei tetanischen Zuständen. Tetanie geht mit einer Neigung zur Hypoglykämie einher. So fanden *Underhill* und *Watanabe* bei der parathyreopriven wie auch bei der Guanidintetanie erniedrigte Blutzuckerwerte. Auch bei der idiopathischen Tetanie der Säuglinge und Erwachsenen besteht nach *Petenyi* und *Lax* eine gewisse Neigung zur Hypoglykämie[1]).

Wir gingen bei unseren Untersuchungen in der Weise vor, daß wir die forcierte Atmung im nüchternen Zustande haben vornehmen lassen. Vor dem Beginn der Atmung wurde Blut entnommen und Urin entleert. Das gleiche wiederholten wir auch auf dem Höhepunkt der Atmungstetanie und 1½ bis 3 Stunden nach dem Abklingen des tetanischen Zustandes. Im Serum bestimmten wir jeweils den anorgenischen Phosphor (nach *Mariott-Haessler*), Kalk (nach *Kramer-Tisdall*), und Kalium (nach *Kramer-Tisdall*). Die Blutzuckerbestimmung erfolgte nach *Bang* im Gesamtblute. Die Urinuntersuchung erstreckte sich auf die kolorimetrische p_H-Bestimmung (nach *Michaelis*), auf die Ermittlung der Gesamtazidität (ebenfalls nach *Michaelis*) und auf die des N- und NH_3-Gehaltes (Mikrokjeldahl). Die Gesamtazidität, der N- und NH_3-Gehalt werden in $^1/_{10}$ Normalität pro 100 ccm ausgedrückt. Der NH_3-Quotient wurde aus den N- und den zugehörigen NH_3-Werten in der üblichen Weise gewonnen.

Auf die Analyse der einzelnen Fälle möchten wir verzichten und weisen diesbezüglich auf die im Anhang aufgenommene tabellarische Zusammenstellung hin.

Die Urinuntersuchung ergab nichts Neues. Sie bestätigte die Angaben der schon zitierten Autoren.

1. Eine regelmäßige Abnahme der Gesamtazidität sowie die der kolorimetrisch festgestellten H-Ionenkonzentration.

2. Eine ebenfalls regelmäßige Erniedrigung der Ammoniakausscheidung und parallel damit eine deutliche Senkung des NH_3-Quotienten.

Ein völliges Verschwinden des Ammoniaks konnten wir im Gegensatz zu *Davies, Haldane* und *Kennaway* in keinem unserer Fälle beobachten.

[1]) Vgl. auch folgende Arbeit von *György* und *Herzberg*.

Die Blutzuckerwerte weisen im tetanischen Stadium eine deutliche und regelmäßige Tendenz zur *Hypoglykämie* auf. Die aus den Einzeldaten gezogenen Mittelwerte illustrieren das Gesagte:

vor der Atmungstetanie	0,105
während der Atmungstetanie	0,074
nach der Atmungstetanie	0,095

Die anorganische Blutsalzzusammensetzung zeigt kein eindeutig regelmäßiges Verhalten. So konnten wir während des tetanischen Stadiums neben leicht erhöhten auch leicht erniedrigte Serum-P- und Serum-K-Werte nachweisen. Allein der Serumkalk zeichnet sich durch eine auffallende Konstanz oder eine nur ganz leichte Erhöhung aus, die übrigens auch schon von *Grant* und *Goldmann* beschrieben wurde. Es ergeben sich folgende Mittelwerte für das Ca:

vor der Atmungstetanie	10,4
während der Atmungstetanie	11,54
nach der Atmungstetanie	10,5

Ziehen wir die Mittelwerte für das Kalium und für den Phosphor, so erhalten wir trotz gewisser Abweichungen in Einzelfällen eine beachtenswerte Konstanz:

	P	K
vor der Atmungstetanie	2,9	20,17
während der Atmungstetanie . . .	2,64	20,2
nach der Atmungstetanie	3,14	20,09

Wir sehen also, daß man für den Phosphor auf Grund dieser angegebenen Mittelwerte eher von einer leichten Neigung zur Abnahme des tetanischen Stadiums als von einer Stauung sprechen könnte. *Die Atmungstetanie ist keine Phosphattetanie.* In Bestätigung der oben entwickelten Anschauungen vermissen wir sowohl eine Ca-Abnahme, wie auch eine K-Zunahme. Die Atmungstetanie dürfte demnach ihr Entstehen einzig und allein *der starken Erniedrigung der wahren Blutazidität* verdanken.

Es soll nur nebenbei bemerkt werden, daß die von uns für die einzelnen anorganischen Blutbestandteile (P, K, Ca) gefundenen Mittelwerte im besten Einklang mit den in der Literatur verzeichneten Werten stehen.

Auf die Klinik der Atmungstetanie möchten wir im Rahmen unserer vorliegenden Mitteilung nicht näher eingehen, zumal *Behrendt* und *Freudenberg* in ihren schon erwähnten Studien bereits diese Seite des Problems näher beleuchtet haben. Wir heben nur ausdrücklich hervor, auch auf Grund von Eigenversuchen, daß das Symptomenbild der voll ausgeprägten Atmungstetanie dasselbe ist, wie wir es bei der idiopathischen Tetanie der Säuglinge und der Erwachsenen zu sehen gewohnt sind. Wir glauben diesen Punkt um so mehr betonen

zu müssen, weil wir in ihm eine, wenn auch nur indirekte Bestätigung für unsere unitaristische Auffassung vom Wesen der Tetanie, als von einer durch Ca-Entionisierung bedingten Nervenübererregbarkeit erblicken. Wenn nun neuerdings *Greenwald* in der schon von *Haldane* angenommenen sogenannten Anoxämie (Stabilitätserhöhung des Oxyhämoglobins im alkalischen Milieu) die einzige Ursache der Atmungstetanie erblicken möchte, so hat er für diese seine Auffassung keine experimentellen Beweise geliefert. Er beruft sich auf die Angaben von *Davies*, *Haldane* und *Kennaway*, nach denen die nervösen Störungen im Laufe der forcierten Atmung durch O_2-Zufuhr behoben werden. Durch die O_2-Einatmung soll eben der paradoxe Sauerstoffmangel bekämpft werden. Nun fanden aber *Behrendt* und *Freudenberg*, daß bei vertiefter Atmung an der Sauerstoffbombe die Tetanie, im Gegensatz zu den Beobachtungen der englischen Autoren, ganz so auftritt wie bei gewöhnlicher Atmung, nur daß dabei manche subjektive Beschwerden geringer zu sein scheinen. Die günstige Beeinflussung durch Sauerstoffzufuhr in den Versuchen von *Davies*, *Haldane* und *Kennaway* dürfte demnach eher auf psychischem Gebiete liegen; das geringste Nachlassen der Atmungsintensität mildert eben die tetanischen Erscheinungen. Auch vom theoretischen Standpunkt aus erscheint uns dieser Beweis ex iuvantibus (O_2-Zufuhr) nicht für stichhaltig. Bei der paradoxen Anoxämie handelt es sich nicht um einen tatsächlichen Sauerstoffmangel, sondern um eine durch die erhöhte alkalische Blutreaktion bedingte Erschwerung des Gasaustausches zwischen Blut und Gewebe. Ein besonderer O_2-Reichtum des venösen Blutes, den wir als Folge der Anoxämie erwarten müßten, ist bei der von uns regelmäßig beobachteten stark „venösen" Verfärbung des während des tetanischen Stadiums entnommenen Venenblutes nicht wahrscheinlich. Hier müßten freilich noch besondere Versuche den vollgültigen Beweis liefern.

In manchen unseren Fällen gelang es nach intravenösen, ziemlich hohen Ca-Dosen ($CaCl_2$), trotz fortgesetzter gleichmäßig forcierter Atmung den tetanischen Zustand günstig zu beeinflussen. In anderen Fällen blieb die Wirkung aus. Die durch die Injektion zugeführten Ca-Ionen werden bei den herrschenden Reaktionsverhältnissen rasch entionisiert. Daher das Versagen von geringen Kalkdosen und auch von höheren bei einer stark ausgeprägten Tetanie (Alkalose).

Zusammenfassung.

1. Die Atmungstetanie geht mit einer stark erniedrigten Säureausscheidung im Urin einher. Die ähnlichen in der Literatur angegebenen Angaben werden bestätigt.

2. Die Atmungstetanie führt zu einer geringen Erniedrigung des Blutzuckers.

3. Die anorganische Blutsalzzusammensetzung (P, Ca, K) weist keine Abweichung von der Norm auf.

4. Die Atmungstetanie ist keine Phosphattetanie. Die Ca-Entionisierung wird durch den starken CO_2-Verlust bewirkt.

5. Die pathogenetische Bedeutung der sogenannten paradoxen Anoxämie wird, im Gegensatz zu *Greenwald*, für das Entstehen der Atmungstetanie nicht hoch eingeschätzt.

Literatur.

Behrendt und *Freudenberg*, Klin. Wochenschr. 1923. — *Binger*, Journ. f. exper. Path. u. Pharm. **10**, 1917. — *Clarck*, *Mc Guy*, Proc. of the soc. f. exper. biol. a. med. **18**, 1921. — *Collip* und *Backus*, Amer. Journ. f. Physiol. **51**, 1920. — *Collip*, ebenda **52**, 1921. — *Davies*, *Haldane*, *Kennaway*, ebenda **54**, 1920. — *Frank*, Klin. Wochenschr. 1922. — *Freudenberg* und *György*, Jahrb. f. Kinderheilk. **96**, 1921. — *Grant* und *Goldmann*, Amer. Journ. f. Physiol. **52**, 1920. — *Greenwald*, Journ. f. biol. Chem. **54**, 1922. — *György*, Jahrb. f. Kinderheilk. **99**, 1922. — *Haldane*, *Kellas*, *Kennaway*, Journ. f. Physiol. **53**, 1919. — *Y. Henderson* und *Haggard*, Journ. f. biol. Chem. **33**, 1918. — *Kramer* und *Tisdall*, ebendaselbst **47**, **48**, 1921. — *Leathes*, Brit. med. Journ. 1919. — *Maiweg*, diese Zeitschr. **134**, 1923. — *Marriott* und *Haessler*, Journ. f. biol. Chem. **32**, 1917. — *Petenyi* und *Lax*, diese Zeitschr. **125**, 1921. — *Porges* und *Adlersberg*, Klin. Wochenschr. 1922. — *Rona* und *Takahashi*, diese Zeitschr. **31**, 1911; **49**, 1913. — *Tisdall*, Journ. f. biol. Chem. 54, 1922. — *Underhill* und *Blatherwick*, ebendaselbst **19**, 1914. — *Vernon*, Journ. f. Physiol. **38**, 1909. — *Watanabe*, Journ. f. biol. Chem. **34**, **36**, 1918.

Zeit		Blut				Harn				
		P	Ca	K	Z	A	p_H	NH_3	N	Q
	Dr. *Meyer*.									
4h 20′	Blutentnahme I	4,4	10,4	18,1	0,116	1,3	7,0	6,2	283,5	2,2
5 05	Harnentleerung I . . .	—	—	—	—	—	—	—	—	—
5 06	Beginn der Atmung . .	—	—	—	—	—	—	—	—	—
5 08	Facialis +, Karpopedalspasmen, Paraesthesien	—	—	—	—	—	—	—	—	—
5 08	Blutentnahme II . . .	4,8	12,3	23,6	0,088	—	—	—	—	—
	Ende der Atmung . .	—	—	—	—	—	—	—	—	—
5 40	Harnentleerung II . .	—	—	—	—	0	7,6	4,8	297,0	1,6
6 45	Blutentnahme III . . .	3,6	9,8	20,7	0,112	—	—	—	—	—
	Dr. *Kissoff*.									
4h 40′	Blutentnahme I	2,4	9,2	22,0	0,10	—	—	—	—	—
5 12	Harnentleerung I . . .	—	—	—	—	16,0	6,2	18,3	719	2,5
5 17	Beginn der Atmung . .	—	—	—	—	—	—	—	—	—
5 28	Facialis + +, starke Karpopedalspasmen, Zwerchfellsensationen	—	—	—	—	—	—	—	—	—
5 28	Blutentnahme II . . .	3,3	11,4	22,7	0,086	—	—	—	—	—
	Ende der Atmung . .	—	—	—	—	—	—	—	—	—
6 15	Harnentleerung II . .	—	—	—	—	0	7,75	8,0	550	1,45
6 40	Blutentnahme III . . .	2,2	10,8	20,0	0,10	—	—	—	—	—

Zeit		Blut				Harn				
		P	Ca	K	Z	A	p_H	NH_3	N	Q
	Dr. *Bespalloff*.									
11h00'	Blutentnahme I	3,2	10,8	18,2	0,113	—	—	—	—	—
11 20	Harnentleerung I . . .	—	—	—	—	4,1	5,9	11,4	271,5	4,2
11 24	Beginn der Atmung . .	—	—	—	—	—	—	—	—	—
11 35	Facialis++,Trousseau++ Karpopedalspasmen angedeutet, Karpfenmund	—	—	—	—	—	—	—	—	—
11 35	Blutentnahme II . . .	3,6	11,2	20,1	0,10	—	—	—	—	—
	Ende der Atmung . .	—	—	—	—	—	—	—	—	—
11 50	Harnentleerung II . .	—	—	—	—	0	7,45	4,4	199	2,2
1 00	Blutentnahme III . . .	2,8	11,2	17,1	0,14	—	—	—	—	—
	***Herzberg*.**									
10h20'	Blutentnahme I	1,3	10,6	20,6	0,08	—	—	—	—	—
11 00	Harnentleerung I . . .	—	—	—	—	16,5	5,3	16,3	412	3,95
11 03	Beginn der Atmung . .	—	—	—	—	—	—	—	—	—
11 07	Starke Karpopedalspasmen, Tetaniegesicht .	—	—	—	—	—	—	—	—	—
11 07	Blutentnahme II . . .	1,4	11,6	21,4	—	—	—	—	—	—
11 08	10 ccm Afenil intravenös									
11 13	Geringes Nachlassen der Spasmen	—	—	—	—	—	—	—	—	—
11 16	Ende der Atmung . .	—	—	—	—	—	—	—	—	—
11 25	Harnentleerung II . .	—	—	—	—	0	7,5	7,2	322	2,23
12 40	Blutentnahme III . . .	3,4	12,8	22,4	—	—	—	—	—	—
	***Serfontein*.**									
4h15'	Blutentnahme I	4,0	11,1	19,7	0,108	—	—	—	—	—
4 50	Harnentleerung I . . .	—	—	—	—	3,1	7,1	11,3	437,5	2,6
4 57	Beginn der Atmung . .	—	—	—	—	—	—	—	—	—
5 02	Facialis ++	—	—	—	—	—	—	—	—	—
5 10	Karpopedalspasmen . .	—	—	—	—	—	—	—	—	—
5 11	Blutentnahme II . . .	2,2	11,6	19,0	0,073	—	—	—	—	—
5 16	9 ccm Afenil intravenös	—	—	—	—	—	—	—	—	—
5 17	Subjektiv und objektiv geringe Verminderung der Spasmen	—	—	—	—	—	—	—	—	—
5 18	Ende der Atmung . .	—	—	—	—	—	—	—	—	—
5 25	Harnentleerung II . .	—	—	—	—	0,0	8,1	4,7	375,5	1,26
6 30	Blutentnahme III . . .	3,2	11,3	20,4	0,097	—	—	—	—	—
	Dr. *György*.									
11h30'	Blutentnahme I	2,4	10,2	—	0,09	—	—	—	—	—
11 40	Harnentleerung I . . .	—	—	—	—	0,8	7,1	8,9	185	4,8
11 51	Beginn der Atmung . .	—	—	—	—	—	—	—	—	—
11 55	Facialis ++	—	—	—	—	—	—	—	—	—
11 57	Stärkste Karpopedalspasmen	—	—	—	—	—	—	—	—	—
11 59	Blutentnahme II . . .	3,4	11,2	—	0,055	—	—	—	—	—
12 30	Harnentleerung II . .	—	—	—	—	0	7,7	6,2	259	2,4
12 40	Atmung	—	—	—	—	—	—	—	—	—
12 50	Tetaniegesicht, stärkste, unlösbare Karpopedalspasmen	—	—	—	—	—	—	—	—	—
12 50	10 ccm Afenil intravenös									
12 52	Keine Besserung . . .	—	—	—	—	—	—	—	—	—

Zeit		Blut P	Blut Ca	Blut K	Blut Z
	E. Koch.				
10h 15′	Blutentnahme I	3,9	10,4	23,4	0,09
10 53	Beginn der Atmung	—	—	—	—
11 08	Facialis ++, Trousseau ++, Karpopedalspasmen angedeutet	—	—	—	—
11 08	Blutentnahme II	2,5	12,4	24,5	0,06
12 40	Blutentnahme III	4,2	10,8	22,7	0,07
	Yi-Tsu Wu.				
4h 15′	Blutentnahme I	3,0	10,2	17,8	0,123
5 00	Beginn der Atmung	—	—	—	—
5 05	Facialis +, Paraesthesien	—	—	—	—
5 10	Trousseau	—	—	—	—
5 12	Leichte Karpopedalspasmen	—	—	—	—
5 12	Blutentnahme II	2,6	10,7	19,1	0,105
7 00	Blutentnahme III	3,0	10,4	21,6	0,123
	Dr. *Jacobssohn.*				
4h 30′	Blutentnahme I	1,2	11,2	20,5	0,1
4 53	Beginn der Atmung	—	—	—	—
4 55	Facialis +	—	—	—	—
4 57	Starke Karpopedalspasmen	—	—	—	—
4 57	Blutentnahme II	2,6	12,8	19,5	0,085
	Ende der Atmung	—	—	—	—
7 30	Blutentnahme III	1,8	10,3	18,5	0,105

Zeit		Blut P	Blut Ca	Blut K
	Dr. *Asal.*			
4h 55′	Blutentnahme I	3,8	10,2	19,6
5 01	Beginn der Atmung	—	—	—
5 05	Facialis ++	—	—	—
5 07	Tetaniegesicht, starke Karpopedalspasmen	—	—	—
5 08	Blutentnahme II, 10 ccm Afenil	1,7	11,2	16,2
5 10	Objektiv und subjektiv keine Besserung. Ende der Atmung	—	—	—
5 16	Immer noch Andeutung von Karpopedalspasmen	—	—	—
	Frl. *Wesenfeld.*			
4h 55′	Blutentnahme I	1,4	10,4	—
5 01	Beginn der Atmung	—	—	—
5 05	Facialis —, starke aktiv nicht lösbare Karpopedalspasmen	—	—	—
5 07	Blutentnahme II	2,8	12,0	—
	5 ccm Calc. chlorat. 10 Proz. intravenös	—	—	—
5 10	Spasmen verschlimmert, passiv kaum lösbar. Ende der Atmung	—	—	—

Zeit		Blut P	Blut Ca	Blut K
	Frl. *Hochhäusler*.			
3h 20′	Blutentnahme I	4,2	—	—
3 31	Beginn der Atmung	—	—	—
3 34	Facialis +, Pfötchenstellung	—	—	—
3 38	Stärkste, unlösbare Karpopedalspasmen. Tetaniegesicht	—	—	—
	Blutentnahme II	2,4	—	—
3 38	10 ccm 10proz. Calc. chlorat. intravenös	—	—	—
3 40	Objektiv und subjektiv ausgesprochene Besserung der Symptome. Spasmen aktiv lösbar	—	—	—
	Ende der Atmung	—	—	—
	Frl. *Dieckmann*.			
4h 33′	Blutentnahme	3,6	10,4	20,8
4 43	Beginn der Atmung	—	—	—
4 54	Karpopedalspasmen angedeutet, Facialis —	—	—	—
4 58	Starke Spasmen, Tetaniegesicht, Facialis —	—	—	—
	Blutentnahme II	2,4	10,7	15,4
5 00	10 ccm 10proz. Calc. chlorat. intravenös	—	—	—
5 02	Pedalspasmen verschwinden	—	—	—
5 05	Karpalspasmen aus nicht gestautem Arm verschwunden	—	—	—
	Ende der Atmung	—	—	—
6 30	Blutentnahme III	4,6	12,2	17,8
	Metz.			
4h 45′	Blutentnahme I	2,2	9,6	20,6
4 49	Beginn der Atmung	—	—	—
5 05	Facialis +	—	—	—
5 16	Tetaniegesicht, leichte Spasmen	—	—	—
5 27	Mäßige Karpopedalspasmen	—	—	—
	Blutentnahme II	1,6	10,0	17,0
5 28	10 ccm 10proz. Calc. chlorat. intravenös	—	—	—
5 30	Paraesthesien verschwanden, in den Händen keine Spannung mehr. Ende der Atmung	—	—	—
7 10	Blutentnahme III	2,6	10,0	22,0

Beitrag zum Mechanismus der glykämischen Reaktion nach subkutaner Adrenalinzufuhr.

Von

P. György und **E. Herzberg.**

(Aus der Heidelberger Kinderklinik.)

(Eingegangen am 20. Juni 1923.)

Mit 7 Abbildungen im Text.

Unter normalen Bedingungen löst subkutan oder intravenös verabreichtes Adrenalin eine starke, nur langsam abklingende hyperglykämische Reaktion aus. Die Erhöhung des Blutzuckerspiegels steht mit der glykogenmobilisierenden Wirkung des Adrenalins in kausaler Beziehung. Es erhebt sich nun die Frage, wieso es unter normalen Bedingungen nach Adrenalinzufuhr zum Glykogenabbau kommt? Und was man unter normalen Bedingungen versteht? Mit der Beantwortung dieser Fragen haben sich in letzter Zeit eine ganze Reihe von Autoren befaßt. Es ergaben sich im Laufe dieser Untersuchungen beachtenswerte Beziehungen zwischen der Adrenalinwirkung und dem intermediären Säurestoffwechsel. Eine der wichtigsten „normalen" Bedingungen dürfte durch das Säure-Basengleichgewicht gegeben sein.

Es würde zu weit führen, auf die in der letzten Zeit stark angeschwollene Literatur dieses Fragenkomplexes näher einzugehen. Wir möchten uns nur auf die Wiedergabe der wichtigsten Befunde beschränken.

So gelang schon *Kretschmer*, später *Pollak* und *Fröhlich*, der Nachweis der aktivierenden Wirkung des Säurezusatzes auf die Glykogenmobilisierung in der Leber durch Adrenalin. Andererseits konnten wiederum *Pollak* und *Fröhlich*, wie auch *Elias* und *Samartino*, die glykogenmobilisierende Wirkung des Adrenalins an der überlebenden Kaltblüterleber mit Alkali völlig unterdrücken. Am Gesamtorganismus beobachteten *Underhill* und seine Mitarbeiter durch Sodainjektion ebenfalls eine, wenn auch mäßige Abschwächung der Adrenalinhyperglykämie. Auch *Gottschalk* und *Pohle* berichten über Versuche, die nach peroraler Zufuhr einer starken Bicarbonatlösung eine deutliche Hemmung der Adrenalinhyperglykämie ergaben. Die Alkaliwirkung dürfte nicht auf eine vielfach angenommene Zerstörung des Adrenalins im alkalischen Milieu zurückzuführen sein.

Diesen Einwand konnten *Elias* und *Samartino*, sowie *Gottschalk* und *Pohle* in entsprechenden Versuchen einwandfrei entkräften. So erwies sich an der überlebenden Kaltblüterleber das eben noch in alkalischer Lösung unwirksame Adrenalin in der neutralisierten Lösung wieder wirksam (*Elias-Samartino*). Die Glykogenmobilisierung findet demnach auch bei Verschiebung der Reaktion gegen die alkalische Seite zu nicht mehr oder nur erschwert statt. Es könnte freilich auch noch eine andere Möglichkeit vorliegen. Gehört zu den normalen Bedingungen der Glykogenmobilisierung nach subkutaner oder intravenöser Adrenalinzufuhr eine Erhöhung der intermediären Säurebildung eine, wenn auch nur vorübergehende Azidose, so wird durch Alkaliverabreichung diese Azidose bekämpft; die Reaktion kann sich nicht gegen die saure Seite verschieben und die Hyperglykämie bleibt aus. Schon die erwähnten Befunde *Kretschmers* u. a., wie auch gewisse Analogien zum Säurehungerdiabetes (*Elias* und *Kolb*) sprechen in diesem Sinne. Tatsächlich gelang es *Gottschalk* und *Pohle*, den eindeutigen Beweis für die Richtigkeit dieser These zu erbringen. Sie wiesen nach subkutaner Adrenalinzufuhr bei Kaninchen im Pfortaderblute und in noch höherem Maße im Blute der abführenden Lebervene eine Zunahme der wahren Blutreaktion nach, die sie mithin auf erhöhte Säurebildung im Lebergewebe beziehen (Milchsäure, *Elias-Samartino*). Die Azidose nach subkutaner Adrenalinzufuhr ließ sich auch im Gesamtblute an der Abnahme der titrierbaren Blutalkaleszenz (*Elias-Samartino*), an der Alkalireserve (*Kornfeld-Elias*, *Tatum*) wie auch an der alveolaren Kohlensäurespannung nachweisen. Während diese Funde am Kaninchen stark ausgesprochen waren, waren sie nach den Versuchen *Elias-Kornfelds* bei Hunden nicht zu erheben. Auch bei Menschen fanden die Autoren nur eine geringfügige Herabsetzung der CO_2-Spannung. Demgegenüber gelang es *Vollmer*, bei Kindern 1 bis 1½ Stunde nach der Adrenalinzufuhr eine erhöhte Säureausscheidung im Urin quantitativ festzustellen, die er auf erhöhte intermediäre Säurebildung bezieht.

Zu den normalen Bedingungen der Glykogenmobilisierung nach Adrenalinzufuhr gehört die initiale Azidose bzw. ein Zustand im intermediären Säure-Basengleichgewicht, der die initiale Azidose und so auch die lokale Säuerung in der Leber zuläßt. Die erhöhte Säurebildung wäre nur *eine* der normalen Bedingungen. Wir stimmen *Kornfeld* und *Elias*, wie auch *Gottschalk* und *Pohle* u. a. vollkommen zu, wenn sie die Adrenalinhyperglykämie nicht allein auf diese, wenn auch notwendige Bedingung zurückgeführt sehen möchten.

Die Richtigkeit der angenommenen These vorausgesetzt, dürften azidotische Zustände mit einer besonders starken hyperglykämischen Reaktion einhergehen. Bei alkalotischen Zuständen mußte demgegenüber die Glykogenmobilisierung durch Adrenalin stark gehemmt oder völlig unterdrückt gefunden werden. Die Adrenalinblutzuckerkurve könnte uns demnach über die allgemeine Stoffwechselrichtung, über das Säure-Basengleichgewicht, wenn auch nur in groben Zügen, Aufschluß geben. Das wäre um so wichtiger, weil die übliche Untersuchungsmethode bekanntlich oft nicht einmal die einfach erscheinende Frage: Liegt im gegebenen Falle Azidose oder Alkalose vor, eindeutig entscheiden kann. Wir erinnern nur an die Gegensätze zwischen den Theorien von *Barcroft* und *Haggard-Y. Henderson*.

Nachdem der eine von uns (*György*) gemeinsam mit *Freudenberg* die Anschauung vertritt, daß die Tetanie mit einer alkalotischen, und die

Rachitis mit einer azidotischen Stoffwechselrichtung einhergeht, und diese These von verschiedenen Seiten in offenen und versteckten Angriffen bekämpft wird, glaubten wir das Verhalten der Adrenalinblutzuckerkurve in diesen Zuständen für oder wider unsere Auffassung verwerten zu können.

Gehört die „Alkalose" zu den notwendigen Bedingungen einer tetanischen Nervenübererregbarkeit, so darf eine Glykogenmobilisierung nach Adrenalinzufuhr nicht oder nur in geringem Maße stattfinden. Tatsächlich gelangte *Petenyi* und *Lax*, und neuerdings *Beumer* und *Schäfer* (unabhängig voneinander) zu diesem gewissermaßen theoretisch postulierten Resultat. Bei Tetaniekranken — sowohl bei Säuglingen wie auch bei Erwachsenen — fanden die erwähnten Autoren die Adrenalinhyperglykämie stark heragbesetzt; sie kann sogar vollständig fehlen.

Hier müssen wir noch auf eine weitere Beobachtung, die wir ebenfalls *Petenyi* und *Lax* verdanken, näher eingehen. Sie betrifft die sogenannte hypoglykämische Phase nach Adrenalininjektion. Bei Gesunden tritt nach Abklingen der durch Adrenalin bedingten Hyperglykämie regelmäßig ein zweites, hypoglykämisches Stadium auf. Da eine zweite Adrenalininjektion, die in dieses hypoglykämische Stadium fällt, wiederum zu einer Erhöhung des Blutzuckerspiegels führt, so darf diese Hypoglykämie nicht auf eine Verarmung der Leber an Glykogen, auf eine einfache Kompensationserscheinung zurückgeführt werden. Sie dürfte nach der Ansicht der erwähnten Autoren mit der Adrenalinwirkung in kausaler Beziehung stehen. Die beste Stütze für diese ihre Auffassung erblicken sie in den Adrenalinblutzuckerkurven bei Tetanie. Hier tritt nach einer Adrenalininjektion eine hypoglykämische Phase auch dann auf, wenn eine vorherige Hyperglykämie vollständig fehlt. Die Hypoglykämie ist eine von der Hyperglykämie unabhängige Erscheinung. Sie dürfte als eine *paradoxe Umkehrung* der „normalen" Adrenalinwirkung bezeichnet werden.

Eine ähnliche Beobachtung teilt *Dale* mit. Bei mit großen Ergotoxindosen vergifteten Tieren führt Adrenalin zu *Blutdrucksenkung* (Phänomen der vasomotorischen Umkehrung nach *Dale*).

Es lag nun sehr nahe, nicht nur die Abschwächung der Hyperglykämie, sondern — und vielleicht noch mehr — auch die hypoglykämische Phase auf die alkalotische Stoffwechselrichtung zurückzuführen. Entspricht diese Annahme den Tatsachen, so müßten alkalotische Zustände oft mit einer hypoglykämischen, azidotisch wirkende Mittel dagegen — worauf wir schon oben hingewiesen haben — mit einer verstärkten hyperglykämischen Reaktion nach Adrenalin einhergehen.

Experimenteller Teil.

Wir wählten zu unseren Versuchen gesunde Kinder im Alter von 1/2 bis 7 Jahren. Die Adrenalinblutzuckerkurve wurde bestimmt:

a) ohne Vorbehandlung,

b) nach einer zweitägigen Bicarbonatvorbehandlung,

c) nach einer zweitägigen Salmiak-(NH_4Cl-)Vorbehandlung,

d) nach einer Bestrahlung (Quarzlicht) von 3 bis 5 Minuten.

Der Blutzucker wurde nach *Bang* in der Modifikation von *Ernst-Weiss* bestimmt. Die erste Blutentnahme erfolgte 3 bis 4 Stunden

nach der letzten Nahrungsaufnahme. Die Kinder blieben während der ganzen Versuchsdauer nüchtern.

Erwartungsgemäß zeigte die Adrenalinblutzuckerkurve nach Salmiakvorbehandlung durchweg eine weit stärkere hyperglykämische Reaktion als die Vergleichskurve ohne Vorbehandlung, während Bicarbonatvorbehandlung und Bestrahlung in der Tat eine Hemmung der Glykogenmobilisierung und in der Mehrzahl der Fälle eine Hypoglykämie nach Adrenalinzufuhr aufweist. Besonders eindrucksvoll sind in dieser Hinsicht die Abb. 1 bis 3 und 6. Im Gegensatz zu den erwähnten Literaturangaben bleibt die Adrenalinwirkung auf den

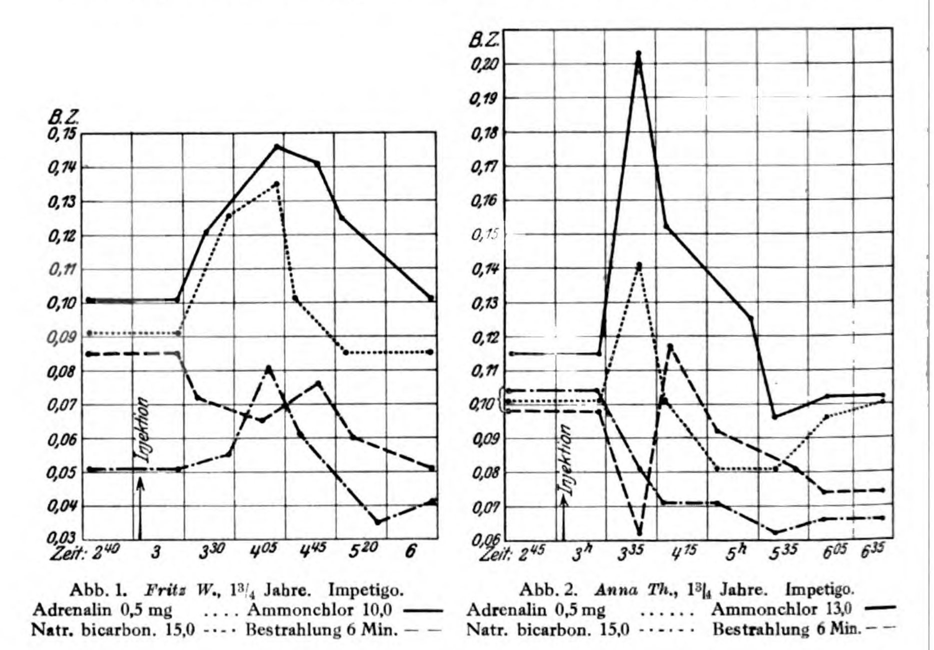


Abb. 1. *Fritz W.*, 1¾ Jahre. Impetigo.
Adrenalin 0,5 mg .... Ammonchlor 10,0 ——
Natr. bicarbon. 15,0 ---- Bestrahlung 6 Min. — —

Abb. 2. *Anna Th.*, 1¾ Jahre. Impetigo.
Adrenalin 0,5 mg ...... Ammonchlor 13,0 ——
Natr. bicarbon. 15,0 ------ Bestrahlung 6 Min. — —

Blutzucker nach Bicarbonatzufuhr nicht aus, sie erscheint in einer paradoxen Form, in einer Umkehrung der hyperglykämischen Reaktion, genau so wie bei der Tetanie. Auch die Bestrahlung schafft die gleichen Bedingungen. Man müßte folgerichtig an eine alkalotische Umstimmung des Stoffwechsels unter dem Einfluß der ultravioletten Strahlen denken. Tatsächlich gelang *Ederer*, durch Bestimmung der alveolaren CO_2-Spannung, und dem einen von uns (*György*), durch Verfolgung der Säureausscheidung im Urin die alkalotische Verschiebung im intermediären Stoffwechsel nachzuweisen. Die Adrenalinblutzuckerkurve nach Bestrahlung bestätigt mithin auf indirektem Wege das Vorhandensein einer alkalotischen Stoffwechselrichtung.

Unsere theoretischen Überlegungen stehen mit den experimentellen Ergebnissen im besten Einklang. Eine Ergänzung zu unserer These erblicken wir noch in den Beobachtungen von *Underhill*, sowie *Beumer* und *Schäfer*, die nach Kalkvorbehandlung ebenfalls erhöhte hyperglykämische Werte auf der aufgenommenen Adrenalinblutzuckerkurve registrieren konnten. Auch Kalk führt zu einer azidotischen Umstimmung des Stoffwechsels und mithin zu einer Begünstigung der Glykogenmobilisierung.

Fassen wir die mitgeteilten Befunde kurz tabellarisch zusammen, so ergeben sich zwei Gruppen:

Hypoglykämische Reaktion:	Hyperglykämische Reaktion:
Bicarbonatvorbehandlung,	„Normal“,
Bestrahlung,	NH_4Cl-Vorbehandlung,
Tetanie.	Ca-Vorbehandlung.

In neueren Versuchen konnte der eine von uns (*Herzberg*) auch bei fieberhaften Zuständen nach Adrenalininjektion hypoglykämische Werte beobachten [Abb. 7[1]].

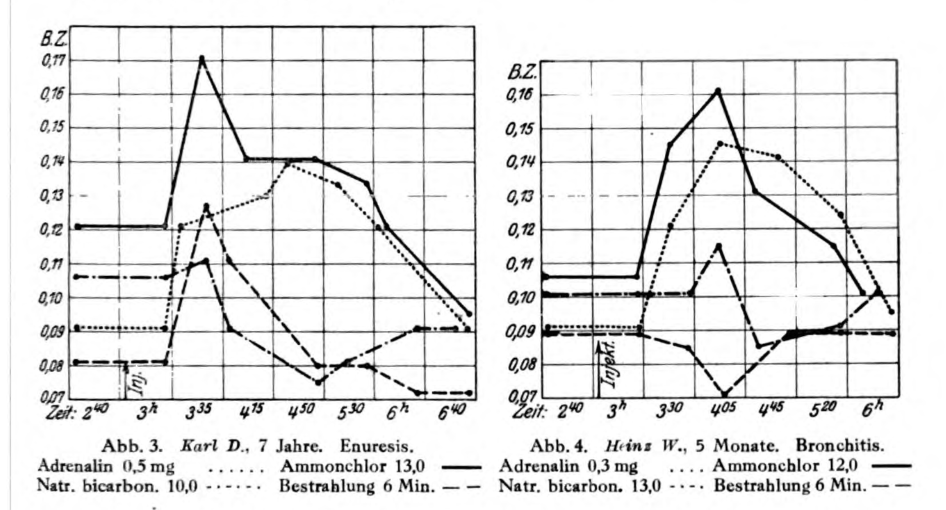


Abb. 3. *Karl D.*, 7 Jahre. Enuresis.
Adrenalin 0,5 mg ...... Ammonchlor 13,0 ——
Natr. bicarbon. 10,0 -·-·-· Bestrahlung 6 Min. — —

Abb. 4. *Heinz W.*, 5 Monate. Bronchitis.
Adrenalin 0,3 mg .... Ammonchlor 12,0 ——
Natr. bicarbon. 13,0 -·-· Bestrahlung 6 Min. — —

Rachitis weist eine hyperglykämische, vielleicht sogar erhöht (*Beumer* und *Schäfer*) hyperglykämische Adrenalinblutzuckerkurve auf. Die von *Petenyi* und *Lax*, sowie von *Beumer* und *Schäfer* beschriebene hypoglykämische Reaktionsform bei Tetanie haben wir in entsprechenden Versuchen ebenfalls feststellen können. Parallel mit dem Verschwinden der manifest-tetanischen Symptome nimmt die Adrenalinblutzuckerkurve wieder eine mehr und mehr hyperglykämische Form an.

---

[1]) Die ausführliche Mitteilung erfolgt später an anderer Stelle.

Vergleichen wir die hypo- und hyperglykämischen Gruppen vom Standpunkt der Tetanielehre miteinander, so ergibt sich eine weitgehende Übereinstimmung mit der von *Freudenberg* und *György* verfochtenen These: Die als tetanigen erkannten Reize stimmen den Stoffwechsel in alkalotischer Richtung um, und umgekehrt, die therapeutisch wirksamen Faktoren führen zu einer erhöhten intermediären Säurebildung. Daß die Bestimmung der Adrenalinblutzuckerkurve nicht als eine vollwertige Bestätigung der erwähnten Lehre gelten kann, möchten wir nicht leugnen. Trotzdem glauben wir, diesem beachtenswerten Parallelismus eine gewisse Beweiskraft zusprechen zu müssen.

Auch in anderer Hinsicht dürften unsere Untersuchungen ein Interesse für sich in Anspruch nehmen. Ausgehend von ihren Studien über die Blutdruckbeeinflussung nach subkutaner Adrenalinzufuhr, vertreten *Balint* und *Goldschmidt* eine Ansicht, die nach den Ergebnissen der vorliegenden Versuche nicht unwidersprochen bleiben kann. Nach den erwähnten Autoren bleibt die blutdruckerhöhende Adrenalinwirkung im Fieber wie auch bei der Atmungstetanie aus dem Grunde aus, weil das Adrenalin infolge der erhöhten Oxydationsvorgänge in den Geweben rasch zerstört wird. Hätten wir beim Fieber bei der Bicarbonatvorbehandlung sowie auch nach der Bestrahlung eine völlige Unbeeinflussung oder nur eine mäßige Erhöhung des Blutzuckerspiegels unter der Einwirkung des subkutan zugeführten Adrenalins beobachtet, so könnte die Annahme von der beschleunigten Zerstörung des Adrenalins in den Geweben zu Recht bestehen. Eine Umkehrung der glykämischen Reaktion, eine hypoglykämische Phase ist aber mit dieser Auffassung nicht in Einklang zu bringen. Nicht das Adrenalin wird zerstört, sondern die ,,normalen" Bedingungen erfahren einen gewissen Um- und Abbau. Hierzu gehört als einer der neu hinzugekommenen Faktoren: die alkalotische Stoffwechselrichtung. Daß neben der Alkalose noch andere Bedingungen im Spiele sein müssen, geht aus den in unserer Klinik ausgeführten Untersuchungen *Vollmers* über die diphasische Wirkung des Adrenalins und über ihre nähere Analyse hervor.

Ob nun die Alkalose bzw. Azidose als direkt wirksame Faktoren im Mechanismus der Adrenalinhyper- und -hypoglykämie teilnehmen, oder auf dem Umwege über die dadurch mitbestimmte Ca-Ionisation, soll an dieser Stelle nicht näher ausgeführt werden. Hier dürfte unser Arbeitsgebiet die Anschauungen *Zondeks* vom Wesen der sympathischen Innervation und Reizung näher berühren. *Beumer* und *Schäfer* führen die abgeschwächte hyperglykämische Reaktion bei Tetanie auf die durch Ca-Mangel bedingte Schwäche des sympathischen Systems zurück. Auch *Freudenberg* und *György* schließen sich dieser Ansicht

in einer polemischen Bemerkung an und erweitern sie noch auf den ganzen Kreis „alkalotischer" Zustände.

Wieso kommt es aber zu einer hypoglykämischen Reaktion? Ist auch die Hypoglykämie das Resultat einer Sympathicusreizung, dann kann von einer Schwäche des sympathischen Systems nicht die Rede sein? Oder aber beruht sie auf einer „Vagusreizung"? Dann müßte wiederum angenommen werden, daß das Adrenalin, das Hormon des Sympathicus, auch den Parasympathicus zu reizen vermag? Die Diskussion dieser Fragen liegt aber außerhalb des Kreises unseres

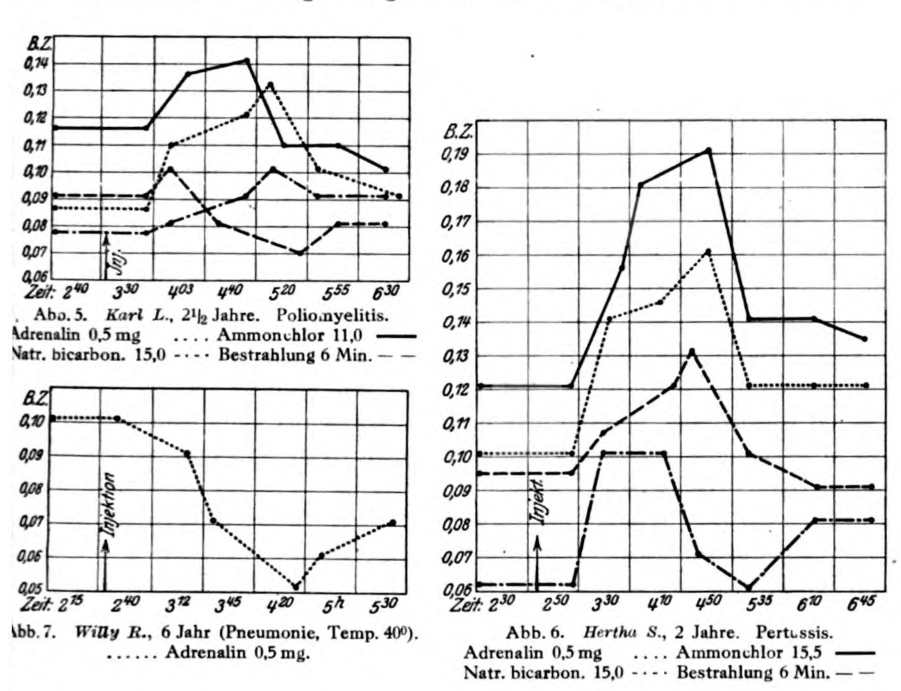


Abb. 5. *Karl L.*, 2½ Jahre. Poliomyelitis.
Adrenalin 0,5 mg .... Ammonchlor 11,0 ——
Natr. bicarbon. 15,0 -·-· Bestrahlung 6 Min. — —

Abb. 7. *Willy R.*, 6 Jahr (Pneumonie, Temp. 40°).
...... Adrenalin 0,5 mg.

Abb. 6. *Hertha S.*, 2 Jahre. Pertussis.
Adrenalin 0,5 mg .... Ammonchlor 15,5 ——
Natr. bicarbon. 15,0 -·-· Bestrahlung 6 Min. — —

Arbeitsgebietes. Für die Beantwortung der Frage, ob Alkaliüberschuß die Glykogensynthese in der Leberzelle zu fördern vermag, wie das von *Elias*, *Mc Leod*, *Underhill* u. a. angenommen wurde, liefern unsere Versuche kein verwertbares Material. Die von *Elias* und *Weiss* beschriebene Vermehrung des Glykogens in den Hefezellen unter Alkaliwirkung konnte neuerdings mit verbesserter Methodik durch *P. Mayer* aus dem *Neuberg*schen Laboratorium nicht bestätigt werden.

Nicht nur die glykämische Reaktion nach Adrenalinzufuhr zeichnet sich je nach der Vorbehandlung durch einen verschiedenen Charakter (hyper- bzw. hypoglykämisch) aus, schon in den Anfangswerten vor der Adrenalininjektion ergaben sich oft die gleichen Unterschiede.

So fanden wir die höchsten Anfangswerte nach Salmiakvorbehandlung, während Bestrahlung und noch mehr die Bicarbonatvorbehandlung oft hypoglykämische Anfangswerte aufweisen. Es kann unter solchen Umständen zu einer eigenartigen Übereinanderlagerung der einzelnen Blutzuckerkurven kommen (Abb. 5). Von unten nach oben ergibt sich die folgende Reihenfolge: „Bicarbonat", „Bestrahlung", „Normal", „Salmiak". Warum unter azidotischen bzw. alkalotischen Bedingungen manchmal hyper- bzw. hypoglykämische Anfangswerte beobachtet werden, ein anderes Mal wieder nicht, bleibt so lange eine ungelöste Frage, bis wir den inneren Mechanismus der Glykogenmobilisierung nicht auch von einem anderen Gesichtspunkt als von dem des Säure-Basengleichgewichtes kennenlernen werden. Hypoglykämische Werte bevorzugen jedenfalls alkalotische, hyperglykämische Werte dagegen azidotische Zustände. So konnten *Underhill* und seine Mitarbeiter bei der Guanidin- und parathyreopriven Tetanie, *Petenyi* und *Lax* in der Mehrzahl ihrer Fälle bei der idiopathischen Tetanie der Säuglinge und der Erwachsenen, *György* und *Vollmer* bei der Atmungstetanie hypoglykämische Werte beobachten. *Rothmann* berichtet neuerdings über erniedrigten Blutdruck und Hypoglykämie nach Bestrahlung. Seine Annahme von einer verminderten Adrenalinbildung in den Nebennieren ist nach alle dem, was wir im Laufe der vorliegenden Untersuchungen mitgeteilt haben, nicht erforderlich. Es liegt wohl auch bei der von *Rothmann* studierten Strahlenwirkung eine *paradoxe* Umkehrung der Adrenalinwirkung bei einem alkalotischen Zustande vor.

Zusammenfassung.

Die glykämische Reaktion nach subkutaner Adrenalinzufuhr besteht aus zwei nacheinander folgenden Phasen: 1. aus einer hyperglykämischen, und 2. aus einer hypoglykämischen Phase. Bicarbonatvorbehandlung, Bestrahlung mit ultravioletten Strahlen, Fieber bedingen eine starke Abschwächung der Hyperglykämie; die zweite, die hypoglykämische Phase beherrscht das Bild. Fehlt die erste hyperglykämische Phase vollständig, so kann von einer paradoxen Umkehrung der Adrenalinblutzuckerkurve gesprochen werden. Auch tetanische Zustände sind durch eine solche „Umkehrung" der Adrenalinblutzuckerkurve ausgezeichnet.

Es liegt nahe, den Mechanismus der paradoxen „Adrenalinreaktion" mit der Alkalose oder mit der durch die Alkalose bestimmten Ca-Entionisierung in Beziehung zu bringen.

Bicarbonatvorbehandlung, Bestrahlung, Tetanie führen oft auch ohne Adrenalin zu einer Hypoglykämie.

Salmiakvorbehandlung verstärkt die Hyperglykämie nach subkutaner Adrenalinzufuhr, löst auch ohne Adrenalin oft eine Hyper-

glykämie aus. Hier dürfte die azidotische Umstimmung des Stoffwechsels mit im Spiele sein.

Es wird ausdrücklich hervorgehoben, daß der verschiedene Ausfall der „Adrenalinblutzuckerkurve" mit der Berücksichtigung der „azidotischen" und „alkalotischen" Stoffwechselrichtung allein noch nicht restlos erklärt wird. Das Säure-Basengleichgewicht spielt in seinem jeweiligen Zustande nur die Rolle *einer* „übergeordneten Bedingung".

Literatur.

Balint und *Goldschmidt*, Jahrb. f. Kinderheilk. **99**, 1921. — *Beumer* und *Schäfer*, Zeitschr. f. Kinderheilk. **28**, 1922. — *Dale*, zit. nach *Langley*, Das autonome Nervensystem. Berlin, Springer, 1922. — *Ederer*, diese Zeitschr. **132**, 1922. — *Elias-Kolb*, ebendaselbst **52**, 1913. — *Elias-Samartino*, ebendaselbst **117**, 1921. — *Elias-Weiss*, ebendaselbst **127**, 1922. — *Ernst-Weiss*, Wien. klin. Wochenschr. 1921. — *Freudenberg-György*, Jahrb. f. Kinderheilk. **96**, 1921; **99**, 1922. — *Fröhlich* und *Pollak*, Arch. f. exper. Path. u. Pharm. **77**, 1914. — *Gottschalk* und *Pohle*, ebendaselbst **95**, 1922. — *György*, Jahrb. f. Kinderheilk. **101**, 1923. — *György* und *Vollmer*, diese Zeitschr. **140**, 391, 1923. — *Kornfeld* und *Elias*, ebendaselbst **133**, 1922. — *Kretschmer*, Arch. f. exper. Path. u. Pharm. **57**, 1907. — *P. Mayer*, diese Zeitschr. **136**, 1923. — *Petenyi* und *Lax*, ebendaselbst **125**, 1921. — *Rothmann*, Klin. Wochenschr. 1923. — *Underhill* und *Blatherwick*, Journ. of biol. Chem. **19**, 1914. — *Underhill*, ebendaselbst **25**, 1916.

Die zweiphasische Wirkung des Adrenalins.

Von

Hermann Vollmer.

(Aus der Heidelberger Kinderklinik.)

(Eingegangen am 20. Juni 1923.)

Mit 2 Abbildungen im Text.

Allgemeiner Teil.

Den anorganischen Bestandteilen des menschlichen Organismus wird erst seit der Einführung der physikalischen Chemie in die medizinischen Wissenschaften die ihnen gebührende Beachtung geschenkt. Damit besteht die Aussicht, daß eine fühlbare Lücke in der innersekretorischen Forschung einmal durch sichere Kenntnisse ausgefüllt und der Kreis sich schließen wird, der das endokrine System, das vegetative Nervensystem und die Ionen miteinander verbindet. Denn nachdem der enge Zusammenhang zwischen den Hormonen und dem autonomen System feststeht, und die letzten Jahre systematische Arbeiten über die Beziehungen zwischen bestimmten Kationen und der Funktion der vegetativen Nerven brachten, sind auch funktionelle Zusammenhänge zwischen den Inkreten und den anorganischen Bestandteilen des Organismus wahrscheinlich geworden. Ja man sieht sich geradezu veranlaßt, ein gemeinsames Zentrum zu postulieren, das die Funktion dieser drei Systeme beherrscht und ihren Gleichgewichtszustand aufrechterhält.

Unter den verschiedenen Hormonen besitzen wir nur im Adrenalin infolge seiner synthetischen Herstellbarkeit den wirksamen Bestandteil eines innersekretorischen Organs in reiner und genau dosierbarer Form, während die meisten übrigen Organpräparate auf Grund des extraktiven Herstellungsverfahrens störende Nebenprodukte enthalten. So bietet das Adrenalin die sicherste Gewähr für eine rein hormonale Wirkung, die nicht wie bei den Organextrakten durch eine gleichzeitige Proteinkörperwirkung überlagert ist.

Die folgenden Untersuchungen wurden nicht in rein theoretischer Einstellung ausgeführt, sondern sie hatten zugleich einen praktischen Hintergrund in den pathogenetischen Fragen der Rachitis und Tetanie. *Freudenberg* und *György* (1) konnten bei beiden Krankheiten eine wohlcharakterisierte Stoffwechselstörung — acidotische Stoffwechselrichtung bei Rachitis, alkalotische Stoffwechselrichtung bei Tetanie

— nachweisen und damit die alte Hypothese einer hormonalen Bedingtheit beider Krankheiten wieder aufnehmen. Meine Untersuchungen (2) über den Einfluß der Hormone auf die Säureausscheidung mit dem Harn, die als Ausdruck der Stoffwechselintensität aufgefaßt wurde, legten die Anschauung nahe, daß den endokrinen Drüsen eine direkte Wirkung auf die Zellatmung und die Stoffwechselrichtung zukomme. Neuerdings neigt jedoch *György* (3) mehr zu der Annahme, daß diese Stoffwechselwirkung der Hormone sich mittelbar auf dem Wege über den Phosphatbestand des Blutserums vollziehen kann. Dafür sprechen zwei Tatsachen: 1. Hormone beeinflussen die Sauerstoffzehrung isolierter Kalbsdarmzellen nur in geringem Grade und nicht entsprechend ihrer oxydationsbeschleunigenden bzw. hemmenden Wirkung im Organismus [*Vollmer* (4)]. 2. Andererseits üben Phosphate auf isolierte Kalbsdarmzellen eine starke oxydationsfördernde Wirkung aus [*György* (5)].

So war die logische Schlußfolgerung berechtigt, daß die Hormone unmittelbar den Phosphatbestand des Blutes und erst mittelbar die oxydative Zellfunktion und damit die Richtung des intermediären Stoffwechsels beeinflussen. Dementsprechend faßt *György* die bei der Rachitis gefundene Phosphatverminderung im Blutserum nicht mehr als Folge, sondern als Ursache der Stoffwechselverlangsamung auf. In analoger Weise wird die Phosphatvermehrung im Tetanikerblut bewertet.

Es blieb also noch der Experimentalbeweis zu erbringen, daß die Hormone tatsächlich einen Einfluß auf den Phosphatgehalt des Blutes haben. Aus den oben angeführten Gründen soll dieser Beweis zunächst für das Adrenalin geliefert werden. Durch diese Versuche sollte zugleich eine andere Frage angegangen werden, die allgemeinerer Natur ist und die Adrenalinwirkung überhaupt betrifft. Vor kurzem konnte gezeigt (4) werden, daß die Säureausscheidung mit dem Harn und damit der intermediäre Stoffwechsel durch Adrenalin in zwei diametralen Phasen beeinflußt wird. Die initiale Azidose (vermehrte Säureausscheidung) schlägt nach etwa 30 Minuten in eine Alkalose (verminderte Säureausscheidung) um. Und zwar übertrifft die zweite Phase die erste weit an Dauer, so daß Stoffwechseluntersuchungen im Gesamttagesharn die azidotische Phase verbargen und als Gesamteffekt eine erhebliche alkalotische Umstimmung des Organismus ergaben. Derartige Schwankungen der Säureausscheidung — die ja als Regulationsmechanismus aufzufassen ist — müssen ihre nächste Ursache in Veränderungen der intermediären Säurebildung haben. Diese aber hängt wiederum von der oxydativen Zellfunktion ab, deren Grad aus den oben angeführten Gründen wohl kaum unter dem direkten Einfluß des Adrenalins steht, sondern, wie wir vermuten, von der Phosphatkonzentration der Blutflüssigkeit abhängt. Wenn sich also im Adre-

nalinversuch überhaupt eine Veränderung des Phosphatgehaltes im Blutserum ergab, so war auch ein zweiphasischer Verlauf dieser Veränderungen zu erwarten, entsprechend den beiden Phasen in der Säureausscheidung. Und zwar müßte, wenn unsere Hypothese sich bewahrheiten soll, der Blutphosphatgehalt nach der Adrenalininjektion zunächst absinken, um dann über den Anfangswert hinaus zu steigen. Jede quantitative Änderung eines anorganischen Bestandteils muß aber aus rein chemisch-physikalischen Gründen und — teleologisch gesprochen — aus regulatorischen Gründen auch das Mengenverhältnis der übrigen anorganischen Stoffe beeinflussen und damit funktionelle Wirkungen ausüben.

Da nun der Zusammenhang zwischen Phosphat- und Ca-Gehalt des Blutes bekannt ist, bezogen wir zunächst auch den Ca-Gehalt des Serums und später auch alle übrigen zum Teil bekannten Adrenalinwirkungen in den Kreis unserer Betrachtungen ein unter dem Hauptgesichtspunkt der zweiphasischen Wirkung.

Methode.

Bei gesunden Kindern und Erwachsenen wurden aus der Cubitalvene 5 bis 10 ccm Blut entnommen und nach eingetretener Gerinnung zentrifugiert. Dann wurde Suprarenin (Höchst) 1 : 1000 in Mengen von 0,5 bis 1,0 ccm teils subkutan, teils intravenös injiziert. In verschieden langen Zeitabständen von der Adrenalininjektion (5 Minuten bis mehrere Stunden) wurden eine bis drei weitere Blutproben entnommen. Die Blutentnahmen wurden mindestens 2 bis 3 Stunden nach der letzten Nahrungsaufnahme ausgeführt. Im Serum wurden die anorganischen Phosphate und das Ca nach den Methoden von *Howland*, *Mariott* und *Haessler* (6) bzw. *Kramer* und *Tisdall* (7) bestimmt. Die intravenöse Adrenalininjektion, deren Gefahr wir kannten und vor der wir warnen möchten, wandten wir nur bei zwei Versuchspersonen an, um eine rasche Adrenalinwirkung zu erzielen. Denn bei subkutaner Applikation verzögert das Adrenalin selbst kraft seiner vasokonstriktorischen Wirkung seine Resorption, der Zeitpunkt der Wirksamkeit ist ungewiß und individuell verschieden. Mit Rücksicht auf die Versuchspersonen war es leider nicht möglich, durch fortlaufende Blutentnahmen Kurven über die Veränderungen des Phosphat- und Calciumgehaltes im Blutserum zu gewinnen. Auf der Suche nach zwei verschiedenen Phasen war es also mehr Zufall, den richtigen Zeitpunkt für die Blutentnahme zu treffen, insbesondere die kurzdauernde erste Phase zu erfassen, zumal bei subkutaner Adrenalinverabreichung die Reaktionszeit auf das Pharmakon individuelle Verschiedenheiten zeigen mußte. Ein Urteil ist darum nur bei Betrachtung der ganzen Versuchsreihe abstractione zu gewinnen.

Versuchsergebnisse.

1. *Phosphate.*

Bei acht unter elf Versuchen gelang es, eine initiale P-Verminderung nachzuweisen, die ganz kurz nach der Adrenalininjektion (etwa 5 Min.) am stärksten ausgesprochen (bis 60 %), und nach 15 Minuten gerade noch zu erfassen war. Ebenso wurde in acht Versuchen die zweite Phase der P-Vermehrung sichtbar, die nur geringe Grade erreichte und frühestens etwa 2 Stunden nach der Adrenalinverabreichung, oft auch viel später auftrat. In den Versuchen 2, 4, 8, 10 und 11 gelang es, die zweiphasische Wirkung des Adrenalins auf den Blutgehalt an anorganischen Phosphaten zu beweisen, und zwar, wie wir nach theoretischen Überlegungen erwarteten, eine initiale Phosphatverminderung entsprechend der früher gefundenen Azidose und eine darauf folgende Phosphatvermehrung in Übereinstimmung mit der sekundären alkalotischen Phase. Zwischen dem P-Bestand des Blutes und der Stoffwechselintensität besteht aber nicht nur ein Verhältnis der Gleichzeitigkeit, sondern auch der kausalen Abhängigkeit. Dafür sprechen am eindeutigsten die Versuche von *Binger* (23), *Jeppson* (24), *Tisdall* (25) und *Frank, Nothmann* u. *Guttmann* (8), denen es gelang, durch Dinatriumphosphat Tetanie (Alkalose) zu erzeugen.

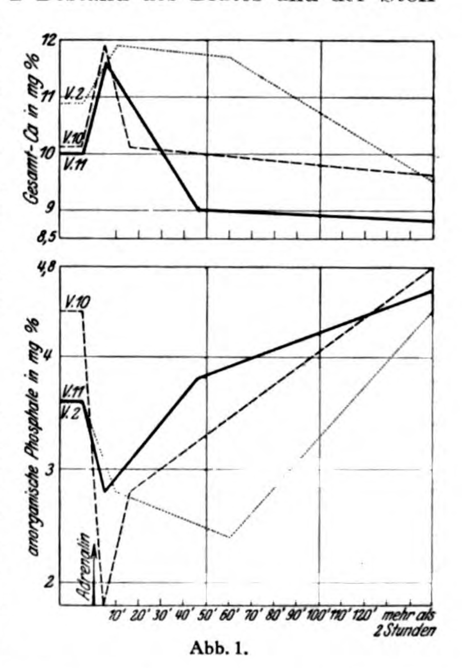


Abb. 1.

2. *Calcium.*

Derartige Verschiebungen des Phosphatgehaltes können nicht ohne Einfluß auf den Ca-Bestand des Blutserums sein. Schon in vitro läßt sich demonstrieren, daß sekundäres Natriumphosphat die Ca-Ionisation hemmt und Ca zur Ausfällung bringt. Im Organismus führt eine Vermehrung des P-Bestandes zu einer Ca-Einlagerung in die Gewebe, P-Verminderung zu einer Gewebsentkalkung und damit zu einer Ca-Vermehrung des Blutes. Wie es nach diesen Zusammenhängen zu erwarten war, fanden wir auch in den meisten unserer Versuche nach der Adrenalininjektion zunächst eine Ca-Vermehrung (erste Phase) und dann erst eine Ca-Verminderung (zweite Phase) im

Blute, also einen gewissen Antagonismus zwischen den P- und Ca-Gehalten, wie aus der folgenden Kurvenschar (P- und Ca-Kurve der Versuchspersonen 2, 10 und 11) ersichtlich ist. Auch hier gelang es aus den oben angeführten Gründen nicht regelmäßig, die erste Phase zu erfassen. Die Versuche 1, 2, 3, 4, 10 und 11 waren in dieser Hinsicht die glücklichsten. Bei einigen Versuchspersonen (1, 3, 4) war die Ca-Vermehrung erst nachzuweisen, nachdem die P-Verminderung bereits abgeklungen war. Schon diese Beobachtung macht es wahrscheinlich, daß die Ca-Veränderungen den P-Veränderungen erst folgen und sich nicht in mathematischer Gleichzeitigkeit vollziehen.

Schon *Billigheimer* (9) konnte mit einer anderen Methode eine Ca-Verminderung im Serum unter dem Einfluß des Adrenalins nachweisen. Wohl infolge seiner Versuchsanordnung ist ihm die erste Phase entgangen. Dadurch wurden *Dresel* und *Katz* (10), die den Einfluß des Adrenalins auf den Blutkaliumgehalt studierten und ihre Befunde denen *Billigheimers* gegenüberstellten, zu Schlüssen veranlaßt, denen wir nicht voll zustimmen können; darauf werden wir später eingehen.

Wie wir aus der Förderung der Zelloxydation durch die Phosphate die erste, azidotische Phase auf die Phosphatverminderung zurückführen konnten, gelingt es uns auch, aus der Ca-Vermehrung die gefundene Stoffwechselherabsetzung herzuleiten. Ca-Vermehrung erniedrigt die Zelloxydation (*Warburg*). P-Verminderung und Ca-Vermehrung summieren sich also in ihrer azidotischen Wirkung während der ersten Adrenalinphase.

Theoretisches.

Nach diesen Befunden war es von Interesse, ob auch die übrigen Adrenalinwirkungen einen zweiphasischen Ablauf zeigen.

Dresel und *Katz* (10) untersuchten den *Kaliumgehalt des Blutes* und fanden, daß dieser nach Adrenalinverabreichung zunächst stark absank, um dann über die Norm hinaus anzusteigen, und zwar ungefähr in zeitlicher Übereinstimmung mit unseren Ca- und P-Befunden. Beide Autoren heben die sekundäre K-Vermehrung nicht besonders hervor; für unsere Fragestellung ist sie jedoch wichtig. Es ist schwer zu entscheiden, ob diese K-Schwankungen eine direkte oder indirekte Adrenalinwirkung darstellen. Da wir wissen, daß Ca-Ionen einwertige Kationen (K') aus ihren Verbindungen mit amphoteren Kolloiden verdrängen [*Freudenberg* und *György* (11)], nehmen wir an, daß die Ca-Verschiebungen den Veränderungen des Blutkaliumgehaltes übergeordnet sind. So erklärt sich auch der Antagonismus zwischen den Ca- und K-Gehalten. In der ersten Adrenalinphase begünstigt die Ca-Verarmung der Gewebe die K-Bindung, die zu einer K-Verminderung des Blutes führt. Die entgegengesetzten Verhältnisse liegen in der zweiten Phase vor. Schließlich unterstützen auch die K-Verschiebungen die Stoffwechselwirkung der Phosphate und des Ca; denn durch die Untersuchungen von *Ph. Ellinger* (12) wissen wir, daß K die Zelloxydation erhöht.

Für die *Adrenalinblutzuckerwirkung* wurde bereits von *Petenyi* und *Lax* (13) ein zweiphasischer Verlauf nachgewiesen. Der initialen Hyperglykämie folgt nach mehreren Stunden eine Hypoglykämie. Und zwar scheint die Zuckermobilisierung von den Änderungen des Säure-Basegleichgewichtes in der Leber abzuhängen und das Glykogen-Glykosegleichgewicht von der Blutazidität beherrscht zu werden [*Underhill* (14), *Fröhlich* und *Pollak* (15), *Elias* und *Sammartino* (16), *Gottschalk* und *Pohle* (17), *György* und *Herzberg* (18)]. Die verschiedenen Adrenalinwirkungen scheinen sich also nicht gleichzeitig, sondern in einer bestimmten Reihenfolge zu vollziehen, die wir folgendermaßen auffassen:

Adrenalin → [P → Ca → K] → Zelloxydation → Blutazidität → Blutzucker.

Der Einfluß des Adrenalins auf das *vegetative Nervensystem* blieb bisher in unseren Betrachtungen unberücksichtigt. Adrenalin wirkt bekanntlich an allen Erfolgsorganen wie eine Sympathicusreizung, und zwar fällt dieser Sympathicotonus zeitlich mit dem zusammen, was wir als erste Adrenalinphase bezeichnet haben. In dieser Phase besteht eine Ca-Vermehrung und K-Verminderung, also eine Elektrolytverschiebung zugunsten des Ca, die nach *Kraus* u. *Zondeck* (19) wie eine Sympathicusreizung wirkt. Es ist fraglich, ob eine Sympathicusreizung eine gleichzeitige Vaguserregung ausschließt (*Eppinger* und *Hess*), ob also Adrenalin lediglich eine Affinität zum Sympathicus zeigt. *Kolm* und *Pick* (20) konnten am Froschherzen nachweisen, daß Adrenalin bei Ca-Mangel wie eine Vagusreizung wirkt; *Turolt* (21) kam bei Uterusversuchen zu ähnlichen Resultaten. Wenn wir die Bedeutung der Elektrolytkombination für die Wirkungsentfaltung sympathischer und parasympathischer Reize (*Kraus*, *Zondeck*) anerkennen, so fallen auch die möglichen Einwände gegen die Theorie *Dresels* (22), der im Gegensatz zu *Eppinger* und *Hess* keinen Antagonismus, sondern einen Synergismus zwischen Vagus und Sympathicus annimmt. Nehmen wir in Übereinstimmung mit *Dresel* eine gleichzeitige sympathische und parasympathische Reizung durch Adrenalin an, so können wir durch die Ca-Vermehrung und K-Verminderung in der ersten Adrenalinphase erklären, warum an den Erfolgsorganen nur die Sympathicusreizung zum Ausdruck kommt. Dann müssen wir aber auch für die zweite Adrenalinphase, die durch K-Vermehrung und Ca-Verminderung im Blute gekennzeichnet ist, eine Vagotonie postulieren. In den späteren Betrachtungen wollen wir auf diese Frage zurückkommen.

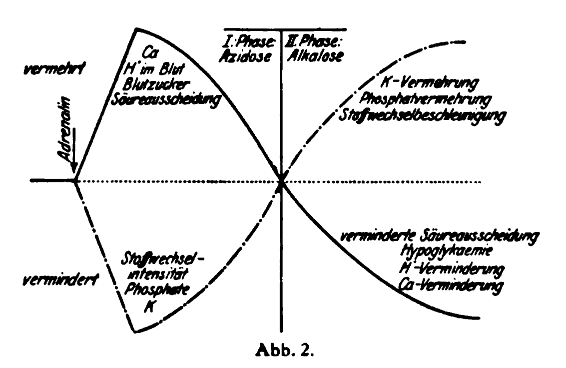


Abb. 2.

Bringen wir die verschiedenen Wirkungen des Adrenalins — soweit sie experimentell sichergestellt sind — unter Berücksichtigung ihres zweiphasischen Ablaufes in ein Schema, so werden wir auf interessante Zusammenhänge aufmerksam. Übersehen wir nämlich die

Adrenalinsymptome der ersten (azidotischen) Phase, so erkennen wir in ihnen mit einer Einschränkung die Symptome der floriden Rachitis:

Azidose,
K-Verminderung im Blute,
P-Verminderung im Blute,
Hyperglykämie,
vermehrte Säureausscheidung mit dem Harn,
Stoffwechselverlangsamung.

Daß bei der Rachitis die absolute Ca-Vermehrung fehlt, erklärt sich aus der negativen Ca-Bilanz. Das aktive Ca muß jedoch nach der von *György* erweiterten Formel von *Rona* und *Takahashi*

$$Ca^{\cdot\cdot} = \frac{H^{\cdot}}{HCO_3^{\cdot} \,.\, HPO_4^{\cdot\cdot}} \cdot k$$

vermehrt sein, da im Rachitikerblute der Faktor HPO_4 vermindert und $H^{\cdot}$, allerdings in engen Grenzen, vermehrt ist.

Die zweite (alkalotische) Phase zeigt uns in überraschender Vollständigkeit alle bisher festgestellten chemisch-physikalischen Symptome der manifesten Tetanie:

Alkalose,
Ca-Verminderung im Blute,
K-Vermehrung im Blute,
P-Vermehrung im Blute,
Hypoglykämie,
verminderte Säureausscheidung mit dem Harn,
Stoffwechselbeschleunigung.

Von verschiedenen Autoren wurde hervorgehoben, daß bei der Tetanie auch vegetative Störungen im Sinne eines parasympathischen Erregungszustandes vorliegen (*Behrendt* und *Kahn*, *Bäumer* und *Schäfer*). Diese Beobachtungen sprechen bei der weitgehenden Übereinstimmung zwischen der Tetanie und der zweiten Adrenalinphase dafür, daß auch bei dieser eine Vagotonie besteht. Ein exakter Beweis dafür steht jedoch noch aus.

Es gelang uns also zu zeigen, daß unter der Einwirkung des Adrenalins im Organismus Veränderungen auftreten, die in ihrem zweiphasischen Ablauf — gleichsam auf einen kurzen Zeitraum zusammengedrängt — mit den bei Rachitis und Tetanie gefundenen Veränderungen übereinstimmen. Das scheinbare Paradoxon, daß Rachitis und Tetanie eine nosologische Einheit darstellen, obwohl beide Krankheiten diametral entgegengesetzte Stoffwechselbefunde zeigen, wird so dem Verständnis nähergerückt.

Weiterhin konnte gezeigt werden, daß das Adrenalin in seiner Endwirkung den Gehalt des Blutes an anorganischen Phosphaten

erhöht. Eine gleiche Wirkung konnte, wie Versuch 12 bis 17 zeigen, auch für das Pituglandol, Ovoglandol und Thymoglandol nachgewiesen werden. Andeutungen für eine zweiphasische Wirkung fanden sich auch bei diesen Präparaten.

Literatur.

1) *Freudenberg* und *György*, Münch. med. Wochenschr. 1922, Nr. 12, S. 422. — 2) *Vollmer*, Jahrb. f. Kinderheilk. **99**, Heft 2/3, 1922. — 3) *György*, Zeitschr. f. Kinderheilk. 1923, im Druck. — 4) *Vollmer*, Arch. f. exper. Path. u. Pharm. 1923. — 5) *György*, Jahrb. f. Kinderheilk. **98**, 245, 1922. — 6) *Howland*, *Mariott* and *Haessler*, Journ. of biol. Chem. **82**, 1917. — 7) *Kramer* and *Tisdall*, ebendaselbst **48**, 1920. — 8) *Frank*, *Nothmann* und *Guttmann*, Klin. Wochenschr. 1923, S. 406. — 9) *Billigheimer*, ebendaselbst 1922, S. 256. — 10) *Dresel* und *Katz*, ebendaselbst 1922, S. 1601. — 11) *Freudenberg* und *György*, diese Zeitschr. **110**, 1920. — 12) *Ph. Ellinger*, Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. **116**, 266, 1921. — 13) *Petenyi* und *Lax*, diese Zeitschr. **125**, Heft 5/6, 1921. — 14) *Underhill*, Journ. of biol. Chem. **25**, 463, 1916. — 15) *Fröhlich* und *Pollak*, Arch. f. exper. Path. u. Pharm. **74**, 265, 1914. — 16) *Elias* und *Sammartino*, diese Zeitschr. **117**, 10, 1921. — 17) *Gottschalk* und *Pohle*, Klin. Wochenschr. 1922, Nr. 26, S. 1310. — 18) *György* und *Herzberg*, diese Zeitschr. 1923, im Druck. — 19) *Zondeck*, Klin. Wochenschr. 1923, Nr. 9, S. 382. — 20) *Kolm* und *Pick*, Pflügers Arch. f d. ges. Physiol. **184**, 79, 1920. — 21) *Turolt*, Arch. f. Gynäkol. **115**, 600, 1922. — 22) *Dresel*, Zeitschr. f. exper. Path. u. Therap. **22**, 1, 1921. — 23) *Binger*, Journ. of pharm. and exp. therap. **10**, 105, 1917. — 24) *Jeppson*. Zeitschr. f. Kinderheilk. **28**, 71, 1921. — 25) *Tisdall*, Journ. of biol. Chem. **54**, 1, 1922.

Experimenteller Teil.

Zeit		Phosphate mg-Proz.	Kalk mg-Proz.
	Versuch 1. Schw. *K.*, 26 Jahre.		
9h 15′	Blutentnahme	3,4	10,3
9 16	Adrenalin 1,0 subkutan	—	—
10 05	Blutentnahme	3,6	13,9
1 00	„	4,5	11,3
	Versuch 2. Frl. *Sch.*, 19 Jahre.		
9h 48′	Blutentnahme	3,6	10,9
9 50	Adrenalin 0,9 subkutan	—	—
10 00	Blutentnahme	2,8	11,9
10 50	„	2,4	11,7
12 40	„	4,4	9,7
	Versuch 3. *H. G.*, 9 Jahre.		
11h 35′	Blutentnahme	6,4	11,1
11 36	Adrenalin 0,5 intravenös	—	—
11 50	Blutentnahme	4,8	10,8
1 10	„	5,6	14,1
	Versuch 4. Frl. *K.*, 20 Jahre.		
10h 45′	Blutentnahme	3,2	10,3
10 45	Adrenalin 0,6 intravenös	—	—
11 00	Blutentnahme	2,0	10,3
1 10	„	3,6	12,3

Zeit		Phosphate mg-Proz.	Kalk mg-Proz.
	Versuch 5. H. Z., 10 Jahre.		
4h 20′	Blutentnahme	2,2	10,2
4 25	Adrenalin 0,4 subkutan . . .	—	—
4 40	Blutentnahme	1,6	9,9
6 20	„	1,6	9,0
	Versuch 6. F. Z., 9 Jahre.		
4h 25′	Blutentnahme	5,0	11,5
4 30	Adrenalin 0,6 subkutan . . .	—	—
4 50	Blutentnahme	2,4	9,5
	Versuch 7. A. K., 12 Jahre.		
9h 20′	Blutentnahme	3,2	10,7
9 22	Adrenalin 0,6 subkutan . . .	—	—
9 42	Blutentnahme	4,0	9,9
12 10	„	5,2	9,3
5 10	„	5,0	8,5
	Versuch 8. M. S., 13 Jahre.		
9h 40′	Blutentnahme	4,2	9,2
9 45	Adrenalin 0,6 subkutan . . .	—	—
9 55	Blutentnahme	2,4	9,2
11 45	„	3,2	9,4
4 40	„	4,4	8,6
	Versuch 9. J. Sch., 12 Jahre.		
9h 48′	Blutentnahme	2,6	9,6
9 51	Adrenalin 0,6 subkutan . . .	—	—
10 03	Blutentnahme	2,6	9,3
12 03	„	2,8	9,1
5 00	„	5,0	8,8
	Versuch 10. G. M., 9 Jahre.		
11h 05′	Blutentnahme	4,4	10,1
11 09	Adrenalin 0,6 subkutan . . .	—	—
11 14	Blutentnahme	1,8	11,9
11 25	„	2,8	10,1
5 00	„	4,8	9,6
	Versuch 11. O. H., 12 Jahre.		
9h 40′	Blutentnahme	3,6	10,0
9 43	Adrenalin 0,6 subkutan . . .	—	—
9 48	Blutentnahme	2,8	11,6
10 30	„	3,8	9,0
12 00	„	4,6	8,8
	Versuch 12. S. K., 12 Jahre.		
9h 15′	Blutentnahme	4,0	9,2
9 16	1,0 Pituglandol subkutan . .	—	—
9 35	Blutentnahme	3,2	10,0
11 30	„	4,6	9,8
	Versuch 13. A. L., 12 Jahre.		
10h 07′	Blutentnahme	4,0	—
10 08	0,1 Pituglandol subkutan . .	—	—
10 20	Blutentnahme	3,4	—
12 10	„	5,4	—

Zeit		Phosphate mg-Proz.	Kalk mg-Proz.
	Versuch 14. H. S., 10 Jahre.		
9h00'	Blutentnahme	3,6	—
9 01	0,1 Pituglandol subkutan . .	—	—
9 15	Blutentnahme	4,0	8,4
11 30	„	4,6	8,0
	Versuch 15. H. G., 9 Jahre.		
9h21'	Blutentnahme	5,2	10,0
9 22	1,0 Ovoglandol subkutan . .	—	—
9 35	Blutentnahme	5,8	11,5
10 30	„	5 2	8,8
12 00	„	5,6	8,2
	Versuch 16. L. Sch., 7 Jahre.		
9h15'	Blutentnahme	4,8	8,8
9 19	1,0 Ovoglandol subkutan . .	—	—
9 39	Blutentnahme	5,6	—
12 00	„	5,8	7,6
	Versuch 17. H. Sch., 11 Jahre.		
9h50'	Blutentnahme	4,8	10,5
9 55	1,0 Thymoglandol subkutan .	—	—
10 30	Blutentnahme	4,0	9,6
12 00	„	5,4	9,6

Über die in vitro auftretenden Veränderungen im Zuckergehalte des Blutserums.

Von

A. Stasiak.

(Aus dem physiologischen Institut der Universität Budapest.)

(Eingegangen am 20. Juni 1923.)

Es gehört unter die schon länger bekannten Erscheinungen, daß der Zuckergehalt des Blutes in vitro Veränderungen unterworfen ist.

Teilweise solche Beobachtungen gaben Anlaß zur Annahme des „sucre virtuel" *Lépines* (1), der fand, daß der Zuckergehalt des Blutes zunahm, wenn er dasselbe 1 Stunde lang auf 58° C erwärmte; allerdings führt er diese Erscheinung auf die Zerstörung des glykolytischen Ferments zurück. Neuerdings zeigten die Untersuchungen *Kornings* (2), daß Blutproben, welche 3 bis 4 Stunden im Brutschrank gehalten sind, erst eine Senkung, dann eine Steigerung des Zuckergehaltes aufweisen. Doch nach Inaktivierung der Blutproben (1 Stunde bei 58° C) fand er den Zucker unverändert, so daß er diese Erscheinung auf eine Fermentwirkung zurückführt. Außerdem soll dieses Verhalten nur das Gesamtblut, nicht aber das Serum aufweisen. Doch sind uns ausführliche Untersuchungen bekannt, welche die Variabilität im Zuckergehalte des Serums erweisen. Ausführliche, in der Richtung angelegte Untersuchungen stammen von *Löwy* (3). Er untersuchte das möglichst steril gehaltene, zentrifugierte, teilweise aber auch das durch Stehen gewonnene Serum verschiedener Kranken. Er bestimmte den Zuckergehalt des nativen und des inaktivierten (1 Stunde 56° C) Serums sogleich und dann nach 24stündigem Verweilen im Brutschrank bei 37° C. Der Serumzucker zeigte ein sehr abwechslungsvolles Verhalten. Teilweise findet *Löwy* eine Zunahme des Zuckers nach der Inaktivierung, und dieses Verhalten meint er hauptsächlich bei akuten Krankheiten feststellen zu können. Hingegen verursacht die Inaktivierung eine Verminderung des Zuckergehaltes bei chronischen Erkrankungen. Doch ist der nach der Inaktivierung erhaltene Zuckerwert kein endgültiger, er kann durch Stehen bei 37° C noch weitere Veränderungen erfahren, so eine Zunahme, wie auch eine Abnahme. Als Ursache dieser Veränderungen nimmt *Löwy* eine chemische Bindung zwischen Eiweiß- und Kohlehydratkörpern an, deren Lösung oder neuere Bindung das Schwanken des Serumzuckers zur Folge hat.

Ich stellte nun ähnliche Untersuchungen an, einesteils bei normalen Individuen, anderenteils bei verschiedenen Kranken. Das Blut wurde aus der Cubitalvene in ein steriles Zentrifugenröhrchen mittels Punktion entnommen; dann zentrifugiert. Während des weiteren Verfahrens wurde stets auf möglichst steriles Arbeiten geachtet. In einem Teile des Serums wurde sofort die Zuckerbestimmung nach *Bangs* (4) Mikromethode in der *Ernst-Weiss*schen (5) Modifikation ausgeführt; ein anderer Teil des Serums wurde inaktiviert (1 Stunde bei 56° C) und nachher darin der Zucker bestimmt. Sowohl das native wie das inaktivierte Serum wurde etwa 24 Stunden im Brutschrank bei 37° C gehalten, wobei zur Verhütung der Verdunstung die Sera in einer Art feuchten Kammer standen, und dann wiederholten Zuckerbestimmungen unterworfen.

Zwecks Raumersparnis will ich von einer detaillierten Wiedergabe meiner Ergebnisse Abstand nehmen und nur deren kurze Zusammenfassung mitteilen.

Zunächst wurden acht gesunde Individuen untersucht; der Zuckergehalt der nativen Sera betrug 0,077 bis 0,106 %, für 100 mg Serum berechnet. Nach dem Inaktivieren und weiterem 24stündigen Stehen bei Brutschranktemperatur erhielt ich verschiedene Zuckerwerte. Meistens vermindert sich der Zuckergehalt nach dem Inaktivieren, indem er z. B. von 0,090 auf 0,069 % fällt, in zwei Fällen nimmt er zu, z. B. von 0,089 auf 0,105 %, in anderen zwei bleibt er unverändert. Nach 24 Stunden zeigt der Zuckerwert weitere Veränderungen, indem er manchmal zu-, ein anderes Mal abnimmt. Wenn wir die Differenz berechnen zwischen dem gefundenen höchsten und niedrigsten Zuckerwert je eines Serums, so bekommen wir die Menge jenes Zuckers, welcher in Lösung bzw. in Bindung treten kann und finden den zwischen 0,026 bis 0,053 schwanken.

Schon diese Befunde bei Normalen schienen gegen *Löwys* (3) Annahme zu sprechen, der glaubt, feststellen zu können, daß Sera akut Erkrankter eine Zunahme, die chronisch Erkrankter eine Abnahme des Zuckergehaltes nach dem Inaktivieren zeigen.

Noch deutlicher sprechen gegen diese Annahme Untersuchungen, welche an Seris verschiedener Kranken angestellt wurden.

Es kamen 25 verschiedene Kranke zur Untersuchung, und es fand sich, daß Sera sowohl akut, als chronisch Erkrankter nach dem Inaktivieren abwechselnd eine Zu- oder Abnahme zeigen können, einigemal auch unverändert bleiben können, ganz ähnlich wie bei gesunden Individuen. Der Zuckergehalt ist während der nächsten 24 Stunden noch beträchtlichen Schwankungen unterworfen. Die nach oben angegebener Weise berechnete Differenz beträgt vom niedrigsten Werte 0,012 bis 0,117. Als Beispiel seien einige Fälle tabellarisch angeführt:

Nr.	Krankheit	Serum nativ	Serum inaktiv	37° C	Differenz
4	Morbus Basedowi	0,174 0,241	0,212 0,291	24h	0,117
5	Nephritis chron.	0,100 0,120	0,113 0,102	22	0,020
6	Scarlatina, Fieber 38° . .	0,104 0,108	0,125 0,125	24	0,021
13	Lupus nasi	0,114 0,110	0,035 0,026	24	0,088
18	Pneumonia croupposa, Temperatur 38°	0,100 0,106	0,090 0,099	24	0,016
21	Stenosis aortae	0,089 0,115	0,090 0,140	24	0,051

Schließlich wurden auch drei Diabetes mellitus-Fälle untersucht; hier gab die Differenz die Werte 0,082 bis 0,087.

Die Differenzwerte geben jedenfalls die Menge jenes Teiles des Serumzuckers, der in gebundener Form im Serum anwesend sein kann, und auf verschiedene Einwirkungen, wie z. B. bei Erwärmen auf 56° C, oder bloß bei 24stündigem Verweilen im Brutschrank, aus diesen Bindungen austreten bzw. wieder in dieselben eingehen kann.

Man könnte annehmen, daß die Menge dieses Zuckers abhängig ist von der Menge des präformierten Serumzuckers, welchen wir mit der sofortigen Bestimmung im nativen Serum finden. Doch bei Betrachtung der Untersuchungsergebnisse findet man, daß die Menge dieses Zuckers unabhängig ist vom Zuckergehalt des nativen Serums, da so Fälle mit Hyperglykämie (wie z. B. in der Tabelle Nr. 4, die Diabetesfälle, deren präformierter Zucker 0,160, 0,280 und 0,300 % war), wie auch solche mit normalen oder gar hypoglykämischen Zuckerwerten (z. B. Lues: präformierter Zucker 0,083 %, die berechnete Differenz 0,080) große gebundene Zuckermengen zeigen können. Hingegen können kleinere Mengen dieses Zuckers vorkommen auch bei hohen Zuckerwerten, z. B. Spondylitis: präformierter Zucker 0,134 %, Differenz 0,026.

Was nun die wirksamen Momente anbelangt, die an der Mobilisierung bzw. Bindung des Serumzuckers teilnehmen könnten, wäre in erster Reihe an die Produkte innersekretorischer Organe zu denken. Ich wollte zunächst die Nebenniere, Schilddrüse und Hypophyse in Betracht nehmen. Deswegen mischte ich zu Seris Adrenalin, Schilddrüsen- und Hypophysenextrakt (sämtliche bezog ich aus der Richterschen Fabrik Chinoin-Ujpest) und brachte sie unter dieselben Bedingungen, wie die Sera in den vorhergehenden Untersuchungen. Parallel wurde der Zuckergehalt derselben Sera bestimmt ohne Zusatz der obengenannten Extrakte. Als Kontrollversuch wurde eine 0,1 proz.

sterile Dextroselösung mit derselben Menge der Extrakte in den Brutschrank gestellt. Doch fielen diese Versuche negativ aus, keines der Sera zeigte mit Zusatz der Organextrakte ein abweichendes Verhalten im Zuckergehalt. Die reine Dextroselösung blieb auch unverändert.

Nach diesen negativen Ergebnissen dachte ich daran, ob die Ursache des variablen Zuckergehaltes nicht im Serum selbst als kolloide Lösung zu suchen ist. In diese Richtung zeigten auch die Versuche, welche ich mit Rinderserum anstellte, zu welchem ich etwa 0,1 % Dextrose zusetzte. Diese Serum-Dextrosegemische zeigten gerade so einen variablen Zuckergehalt wie die Sera vorhergehender Versuche. Es wurden neun Versuche angestellt; dreimal blieb der Zuckergehalt unverändert, d. h. die Differenz war 0,002 bis 0,007, blieb also innerhalb der Grenzen des Versuchsfehlers, in den übrigen war die Menge des in Bindung bzw. in Lösung tretenden Zuckers 0,015 bis 0,052.

Um den Weg zur Erklärung der Variabilität des Serumzuckers zu finden, verfolgte ich nachstehenden Gedankengang. Das Serum stellt eine Lösung verschiedener Kolloide dar. Die große Oberfläche derselben macht diese Kolloide zum Schauplatz verschiedener Adsorptionserscheinungen. Es schien mir möglich, daß die verschiedenen Serumkolloide Eiweißstoffe, wie Albumin und Globulin, vielleicht auch das Cholesterin und Lecithin in eine Adsorption mit dem Zucker eingehen können, und ihre verschiedenen kolloiden Zustandsänderungen, welche durch das Stehen oder Erwärmen verursacht werden können, auch die Adsorption verschieden beeinflussen.

Ich stellte nun Versuche an, indem ich zu Globulin-, Albumin-, Cholesterin- und Lecithinlösungen etwa 0,1 % Dextrose mischte. Diese Mischungen unterwarf ich ähnlichen Bedingungen wie in den vorhergehenden Versuchen die Sera und bestimmte ihren Zuckergehalt.

Es stellte sich nun heraus, daß die Mischung einer 2,8proz. Globulinlösung[1]) mit etwa 0,1 % Dextrosezusatz einen variablen Zuckergehalt aufweist, und zwar ist der Zuckergehalt der sofort untersuchten Mischung stets niedriger, als er der zugesetzten Dextrosemenge nach sein müßte, und erst nach 24 Stunden erreicht der Zuckerwert den dem zugesetzten Zucker entsprechenden Wert. Im Anfang scheint also das Globulin einen Teil des zugesetzten Zuckers zu adsorbieren, und während des Stehens bei Brutschranktemperatur geht dieser gebundene Zucker wieder in Lösung. Die Menge dieses Zuckers war 0,020 bis 0,049. Daß die Zunahme des Zuckergehaltes nicht von den im Globulin eventuell vorhandenen Kohlehydratgruppen herrühren kann, konnte

[1]) Sowohl Globulin wie auch Albumin wurde aus Rinderserum durch Fällung mit Ammonsulfat und nachheriger Dialysierung dargestellt. Das so gewonnene Eiweiß wurde eingetrocknet und aus diesem die jeweilig notwendigen Lösungen dargestellt.

ich so beweisen, daß der Reduktionswert der unter ähnlichen Bedingungen gehaltenen reinen 2,8proz. Globulinlösung unverändert 0,018 blieb.

Ähnliche Erscheinungen sind uns aus der Kolloidchemie anorganischer Sole bekannt und werden als Adsorptionsrückgang (6) benannt, welch letzterer auf die mit der Zeit eintretende Vergröberung der kolloiden Teilchen zurückzuführen ist. Diese Erklärung ließe sich auf eine Globulinlösung leicht anwenden, da ja die Tendenz zur spontanen Ausflockung bzw. Dispersitätsverringerung der Serumeiweißkörper, besonders der Globuline, bekannt ist. Diese Dispersitätsverringerung kann auch einen Rückgang der Adsorption nach sich ziehen.

Denselben Versuch führte ich aus mit einer 3proz. Albuminlösung, der 0,1 % Dextrose zugesetzt war. Doch dieses Gemisch zeigte bei gleichen Bedingungen wie die Globulinlösung einen konstanten Zuckergehalt, entsprechend der zugesetzten Dextrosemenge.

Ähnlich wurde mit einer Mischung von 0,1 % Cholesterin + 0,1 % Dextrose verfahren. Die Herstellung der Cholesterin- und der späteren Lecithinsuspension geschah nach *Porges* und *Neubauer* (7) Die Cholesterin-Dextrosemischung zeigte einen variablen Zuckergehalt, doch im Unterschiede zur Globulinlösung zeigte die sofort untersuchte Mischung den Zuckergehalt der zugesetzten Dextrosemenge entsprechend, welcher sich aber nach 24 Stunden stets verminderte. Die auf übliche Weise berechnete Differenz betrug 0,015 bis 0,045.

Es scheint mir von besonderem Interesse, daß eine 0,1 proz. Lecithin- + 0,1 proz. Dextroselösung keine Veränderung in ihrem Zuckergehalt aufwies, welcher Befund gegen die in der Literatur des Blutzuckers des öfteren wiederkehrende Annahme einer Lecithin-Zuckerverbindung zu sprechen scheint.

Nebenbei sei bemerkt, daß, da nach den Angaben *Rosenthals* (8) reine Zuckerlösungen während des Stehens an der Luft eine Verringerung ihres Zuckergehaltes erfahren, bei meinen Versuchen des öfteren auch reine, sterile Dextroselösungen (0,1 proz.) im Brutschrank gehalten wurden, doch fand ich deren Zuckergehalt binnen 24 Stunden immer konstant.

Zusammenfassung.

1. Das durch Zentrifugieren gewonnene Serum gesunder wie auch kranker Individuen zeigt während des Stehens in vitro einen variablen Zuckergehalt; derselbe kann steigen oder sinken.

2. Diese Veränderung im Zuckergehalt des Serums ist keine Fermentwirkung. Sie ist nicht zu beeinflussen durch Extrakte verschiedener innersekretorischer Organe.

3. Der variable Zuckergehalt scheint mit den kolloiden Zustandsänderungen einzelner Serumbestandteile im Zusammenhange zu sein, da sowohl Globulin-Dextrose- wie auch Cholesterin-Dextrosemischungen Veränderungen im Zuckergehalt aufweisen. Albumin-Dextrose- und Lecithin-Dextrosemischungen zeigen konstante Zuckerwerte.

Literatur.

1) *Lépine*, Le diabète sucré, S. 64 und 66. Paris, Alcan 1909. — 2) *Korning*, ref. Ber. f. Physiol. u. exper. Pharmak. **9**, 544, 1921. — 3) *Löwy*, Deutsch. Arch. f. klin. Med. **120**, 1916. — 4) *Bang*, Mikromethoden zur Blutuntersuchung, 2. Aufl., 1920, S. 35. — 5) *Ernst-Weiss*, Wien. klin. Wochenschr. **34**, 174, 1921. — 6) *Freundlich*, Kapillarchemie, 2. Aufl., 1922, S. 622. — 7) *Porges* und *Neubauer*, diese Zeitschr. **7**, 159, 1908. — 8) *Rosenthal*, ebendaselbst **133**, 469, 1922.

Über eine Reaktion des Harnstoffs mit p-Dimethylamidobenzaldehyd. II.

Von

H. K. Barrenscheen.

(Aus dem medizinisch-chemischen Institut der Universität Wien.)

(Eingegangen am 21. Juni 1923.)

Reaktionen des Harnstoffs mit Aldehyden wurden erstmals von *Hugo Schiff* (1) beschrieben.

In seinen grundlegenden Arbeiten „über kondensierte Harnstoffe“ hat *Schiff* diese Verbindungen in klassischer Weise dargelegt und späteren Forschungen blieb an seinen Feststellungen nur wenig mehr zu ergänzen. *Schiff* selbst zog eine große Anzahl aliphatischer und aromatischer Aldehyde in den Kreis seiner Untersuchungen und zeigte, daß die Kondensation im allgemeinen so vor sich geht, daß zwei Moleküle Harnstoff mit einem Molekül des Aldehyds unter Abspaltung des Carbonylsauerstoffs und zweier Amidwasserstoffe reagieren. Solche Diureide wurden von *Schiff* dargestellt durch Kondensation von Harnstoff mit Valeraldehyd, Önanthaldehyd, Acrolein, Benzaldehyd, Nitrobenzaldehyd, Anisaldehyd, Salicylaldehyd, Zimtaldehyd, Cuminol. Eine Ausnahme von dieser typischen Diureidbildung machen der Formaldehyd und Acetaldehyd, die nur mit je einem Molekül Harnstoff reagieren. Diese Kondensationen vollziehen sich sämtlich mit großer Leichtigkeit schon bei Zimmertemperatur oder bei Siedetemperatur des Alkohols. Zusatz einiger Tropfen verdünnter Säure beschleunigt sie. Durch entsprechende Variation der Versuchsbedingungen gelangte *Schiff* auch zu höheren Kondensationsprodukten, Tri- und Tetraureiden usw. Diese Polyureide von der allgemeinen Formel $n\overset{+}{U} + (n\text{-}1)\,A - (n\text{-}1)\,H_2O$ ($\overset{+}{U}$ = Harnstoff, A = Aldehyd) zerfallen sämtlich ebenso wie die Diureide bei längerem Erhitzen mit Wasser oder wässerigem Alkohol in ihre Komponenten. Gegenwart von geringen Mengen Alkali oder Säure beschleunigt die Zersetzung.

Praktische Bedeutung für den Nachweis des Harnstoffs haben von diesen Reaktionen bisher zwei erlangt: Die von *Schiff* (2) angegebene Farbreaktion mit Furfurol und die von *Lüdy* (3) ausgearbeitete Kondensation mit o-Nitrobenzaldehyd.

Daß die in einer früheren Mitteilung mit *Weltmann* (4) erstmals beschriebene Farbreaktion des Harnstoffs mit dem *Ehrlich*schen Aldehydreagens — einer salzsauren Lösung von p-Dimethylamidobenzaldehyd — auf einer analogen Kondensation beruhen müsse, war von vornherein anzunehmen. Im Verlaufe der Untersuchungen ergaben sich jedoch bald einige bemerkenswerte Unterschiede gegenüber den sonst beobachteten Reaktionen des Harnstoffs mit aromatischen Aldehyden. Während gerade aromatische Aldehyde mit größter Leichtigkeit reagieren, konnte hier die Kondensation weder durch stundenlanges Erhitzen mit Alkohol auf dem Wasserbade noch im Einschlußrohr erzwungen werden. Schließlich gelang die Kondensation durch Eintragen von fein gepulvertem trockenen Aldehyd in geschmolzenen Harnstoff. Die Ausbeute war aber derart schlecht, daß dieser Weg für eine präparative Darstellung wieder verlassen wurde, abgesehen von den Schwierigkeiten, welche die Trennung von den Kondensationsprodukten des Aldehyds mit unvermeidlichen Zersetzungsprodukten des Harnstoffs bereitete. Verhältnismäßig leicht gelang es jedoch, das Ureid in reinem Zustande über die einfach darzustellende salzsaure bzw. schwefelsaure Verbindung zu erhalten. Von den bisher dargestellten Verbindungen des Harnstoffs mit aromatischen Aldehyden unterscheidet sich das neue Ureid prinzipiell dadurch, daß nur ein Molekül Harnstoff mit einem Molekül des Aldehyds zu einem Monoureid, dem p-Dimethylamidobenzylidenmonoureid zusammentritt. Bei eigens darauf gerichteten Versuchen, den von *Schiff* dargestellten Polyureiden analoge Verbindungen zu erhalten, gelang es niemals, höhere Kondensationsprodukte zu bekommen. Dieses von der Regel abweichende Verhalten dürfte zwanglos durch den basischen Charakter beider Reaktionskomponenten erklärt werden, der auch die außerordentlich leichte Zersetzlichkeit der Verbindung durch die geringfügigsten Einwirkungen begreiflich macht. Das dargestellte p-Dimethylamidobenzylidenmonoureid, $N(CH_3)_2.C_6H_4.CH:N.CO.NH_2$, ist hell gelbgrün gefärbt, es bildet mit Säuren durch direkte Addition Salze, der farbige Charakter tritt bei den verschiedenen Salzen noch stärker hervor, die sämtlich orangerot gefärbt sind und deren Lösungen in starker Verdünnung noch deutliche Gelbgrünfärbung erkennen lassen. In ihrem Verhalten zeigen sie weitgehende Ähnlichkeit mit den zuerst von *Hugo Weil* (5) beschriebenen, von *Möhlau* (6) näher untersuchten Kondensationsprodukten des p-Dimethylamidobenzaldehyds mit primären aromatischen Aminen, die sämtlich farbigen bzw. Farbstoffcharakter zeigen. Nach *Möhlau* verdanken diese monomolekularen, gut kristallisierenden Kondensationsprodukte ihren farbigen Charakter der chromophoren Azomethingruppe $.N:CH.$, deren beide freie Valenzen mit aromatischen Resten ver-

bunden sind. Sie lassen sich theoretisch aus den entsprechenden Azofarbstoffen durch Ersatz eines Stickstoffs der Azogruppe durch das gleichwertige Methin . CH: ableiten. Ihre Farbe ist schwächer als die der entsprechenden Azokörper, sie sind zur Salzbildung befähigt und werden durch Erhitzen ihrer wässerigen Lösungen, namentlich bei Gegenwart verdünnter Säuren, leicht in ihre Komponenten gespalten. Die von p-Dimethylamidobenzaldehyd dargestellten Azomethinfarbstoffe sind gelb gefärbt. Die Farbstoffsalze sind sämtlich orangerote bis leuchtend rote Körper. Es ist naheliegend, auch den farbigen Charakter des dargestellten Ureids und seiner Salze auf die analoge Konstitution zurückzuführen. Mit den aromatischen Azomethinverbindungen haben die neu dargestellten gefärbten Harnstoffverbindungen, von der Übereinstimmung der Färbung abgesehen, noch gemeinsam, daß sie ungemein leicht hydrolytisch gespalten werden. Diese hydrolytische Spaltung findet durch Wasser bereits bei Temperatur weit unter 100°, bei stärkeren Verdünnungen schon in der Kälte statt. Freie Säure begünstigt sie, Natronlauge, nicht aber Ammoniak, zerlegt die Verbindung sofort in ihre Komponenten. Diese ungemeine Labilität erschwert die Reindarstellung in unangenehmer Weise.

Außer vom Harnstoff wurden die entsprechenden Verbindungen des Monomethyl- und Monophenylharnstoffs dargestellt. In ihrer Farbe und Kristallisation, sowie in ihren anderen Eigenschaften unterscheiden sie sich nicht wesentlich von den Verbindungen des reinen Harnstoffs. Systematische Untersuchungen an anderen substituierten Harnstoffen und Harnstoffderivaten zeigten, daß die Kondensation unter Farbstoffbildung sich nur bei einfach substituierten Harnstoffen und bei Harnstoffabkömmlingen mit einer noch unbesetzten NH_2-Gruppe findet. Purinderivate lassen sie durchweg vermissen, ebenso einfache Säureamide und fast ausnahmslos die untersuchten Aminosäuren. Ebenso wie Harnstoff ist der Thioharnstoff zur Kondensation befähigt, doch konnte hier die entsprechende Verbindung nicht analysenrein erhalten werden.

Die Reindarstellung der gefärbten Harnstoffverbindungen legte auch Versuche nahe, die Reaktion zu einer exakten quantitativen kolorimetrischen Methode auszugestalten. Die wenig angenehmen Eigenschaften der Verbindungen, speziell die leichte hydrolytische Spaltbarkeit und die fast vollkommene Dissoziation der Farbsalze bei stärkerer Verdünnung erweckten von vornherein wenig Hoffnung auf ein Gelingen. Tatsächlich konnte auch bisher durch verschiedene Variation der Versuchsbedingungen kein Weg gefunden werden, der zu einer befriedigenden Lösung dieser praktisch wichtigen Frage geführt hätte.

Experimenteller Teil.

I.

p-Dimethylamidobenzylidenmonoureid,
$N(CH_3)_2.C_6H_4.CH:N.CO.NH_2$.

Zur Darstellung wurden 1,2 g, entsprechend 2 Mol., aus Alkohol umkristallisierter Harnstoff am Ölbad vorsichtig geschmolzen und in die Schmelze 1,5 g (1 Mol.) fein gepulverter, trockner Aldehyd eingetragen. Es findet sofortige Reaktion unter Gelbfärbung und Erstarren der Masse statt. Die erstarrte Schmelze wird gründlich mit Wasser verrieben, abgesaugt, mit Wasser, Alkohol, Äther gewaschen. Der schließlich zurückbleibende Rückstand besteht mikroskopisch aus feinsten Nadeln, die Ausbeute ist schlecht, auch erweist sich die Substanz nach der N-Bestimmung als nicht ganz rein. Leichter gelingt die Darstellung über die salzsaure bzw. schwefelsaure Verbindung (deren Darstellung s. unten).

1 g salzsaures bzw. schwefelsaures Ureid wird fein gepulvert und in kleinen Portionen in eine geringe Menge 10proz. Ammoniak eingetragen und sorgfältig verrieben. Dabei schlägt die Farbe von Orange in Hellgelb um. Das Eintragen wird so lange fortgesetzt, bis die ganze Masse dünnbreiig ist, erst dann wird erneut Ammoniak zugesetzt. Schließlich wird abgesaugt und mit Wasser bis zur NH_3-Freiheit gewaschen, wobei Verluste nicht zu vermeiden sind. Nachwaschen mit Alkohol und Äther zur Entfernung von freiem Aldehyd. Nach dem Trocknen im Vakuum schmilzt die Substanz unter Zersetzung und Braunfärbung unscharf zwischen 188 bis 190° (n. k.). Bei weiterem Erhitzen geht die Färbung in ein schmutziges Grün über. Mikroskopisch besteht der Körper aus Drusen feinster, anscheinend monokliner Nadeln. Im kalten Wasser ist er schwer, im warmen Wasser leichter, mit hellgelber Farbe löslich. Löslich in Alkohol, Aceton, schwerer in Chloroform, unlöslich in Äther. Auf Säurezusatz schlägt die gelbgrüne Farbe augenblicklich in tiefes Orange um.

N-Bestimmung: 3,299 mg, 0,649 ccm N_2 18°, 739 mm Hg.

Berechnet für $C_{10}H_{13}N_3O$ . . . . 21,99 Proz.
Gefunden . . . . 22,26 ,,

Salzsaures p-Dimethylamidobenzylidenmonoureid,
$N(CH_3)_2.C_6H_4.CH:N.CO.NH_2.HCl$.

1,2 g Aldehyd, entsprechend 1½ Mol., werden in einem geringen Überschuß von 5proz. Salzsäure gelöst und zu der filtrierten Lösung 1,2 g Harnstoff in 2 ccm Wasser gelöst zugesetzt. War zu wenig Salzsäure, so fällt beim Zusatz des Harnstoffs Aldehyd wieder aus. Die Lösung, deren Farbe orangerot mit einem Stich ins Grünliche ist, wird in einer Glasschale im Exsikkator im Vakuum eingedunstet. Nach kurzer Zeit beginnt am Rande Kristallisation, die rasch fortschreitet, namentlich, wenn man das Evakuieren unterbricht und mit dem Glasstab reibt. Schließlich erstarrt die Lösung zu einem Brei orangerot gefärbter Kristalle, die abgesaugt und — unter beträchtlichen Verlusten — mit Wasser, Alkohol und Äther gewaschen werden. Ausbeute rund 1 g. Im Vakuum getrocknet, werden die Kristalle beim Erhitzen bei 171° mißfarbig und schmelzen unter Zersetzung unscharf zwischen 196 bis 201° (n. k.). Mikroskopisch bestehen sie aus schönen, dem monoklinen System angehörenden Nadeln. Die Verbindung spaltet sich ungemein leicht hydrolytisch. Schon beim Versuch, aus Wasser um-

zukristallisieren, fällt der Aldehyd aus. Leichtes Erwärmen der Lösung bringt die gelbgrüne Farbe, die an gesättigte Pikrinsäurelösung erinnert, zum Verschwinden, beim Abkühlen fällt der Aldehyd kristallinisch aus. Zusatz von verdünnter Salzsäure bringt unter Lösung des Aldehyds die ursprüngliche Färbung wieder zum Erscheinen. Stärkere Säurekonzentration führt zu fast vollkommener Entfärbung. Löslich in Alkohol und Aceton, unlöslich in Chloroform und Äther. Durch vorsichtiges Behandeln mit NH_3 erhält man das freie Ureid (s. oben).

N-Bestimmung: 2,53 mg, 0,416 ccm N_2, 25°, 251 mm Hg.
Cl-Bestimmung: 0,2525 g, 0,1595 g AgCl.

Berechnet für $C_{10}H_{13}N_3O.HCl$ . . .	N 18,46 Proz.	Cl 15,58 Proz.
Gefunden	N 18,58 „	Cl 15,63 „

Schwefelsaures p-Dimethylamidobenzylidenmonoureid,
$N(CH_3)_2.C_6H_4.CH{:}N.CO.NH_2.H_2SO_4$.

Darstellung analog der salzsauren Verbindung unter Verwendung 5proz. Schwefelsäure. Die Kristallisation erfolgt hier langsamer, die Kristalle selbst sind leuchtend orangerot gefärbt. Schmelzpunkt unscharf unter Zersetzung. Die hydrolytische Spaltbarkeit ist nicht so ausgeprägt wie bei der salzsauren Verbindung. Die Lösung reagiert schwach kongosauer. Im übrigen sind die Eigenschaften die gleichen wie die des salzsauren Ureids. Verwendung von konzentrierterer Säure — etwa 20proz. — verhindert ebenso wie konzentrierte Salzsäure die Kondensation.

N-Bestimmung: 2,598 mg, 0,330 ccm N_2, 25°, 744 mm Hg.
H_2SO_4-Bestimmung: 0,5059 g, 0,4077 $BaSO_4$.

Berechnet für $C_{10}H_{13}N_3O.H_2SO_4$.	N 14,53 Proz.,	H_2SO_4 33,92 Proz.
Gefunden	N 14,24 „	H_2SO_4 33,86 „

Salpetersaures p-Dimethylamidobenzylidenmonomethylureid,
$N(CH_3)_2.C_6H_4CH{:}N.CO.NH(CH_3).HNO_3$.

1,85 g salpetersaurer Monomethylharnstoff[1]) — entsprechend 1 g Harnstoff — werden mit 1,25 g Aldehyd, entsprechend ½ Mol., in verdünnter Salpetersäure gelöst und die Lösung im Vakuum eingeengt. Nach kurzer Zeit beginnt die Abscheidung von orangefarbenen derben Kristallen, die sich beim Stehen über Nacht beträchtlich vermehren. Nach dem Absaugen und Waschen im Vakuum getrocknet. Derbe, anscheinend rhomboedrische, orange gefärbte Kristalle, die unter Zersetzung zwischen 165 und 169° schmelzen. Löslichkeit wie bei den nichtsubstituierten Verbindungen. Außer dieser Fraktion wird noch aus der Mutterlauge eine zweite Kristallisation von feinen, gelben Nadeln erhalten, die nach den Analysen und dem niedrigen Schmelzpunkt neben dem Ureid noch reichlich nichtkondensierten Aldehyd enthält.

N-Bestimmung: 3,119 mg, 0,5733 ccm N_2, 27°, 747 mm Hg.

Berechnet für $C_{11}H_{15}N_3O.HNO_3$ . .	N 20,81 Proz.
Gefunden	N 20,55 „

---

[1]) Herrn Prof. *Fromm* spreche ich auch an dieser Stelle für die Überlassung des Monomethylharnstoffs und Monophenylharnstoffs aus seiner Privatsammlung meinen Dank aus.

Salzsaures p-Dimethylamidobenzylidenmonophenylureid,
$N(CH_3)_2.C_6H_4.CH:N.CO.NH(C_6H_5).HCl$.

1 g Phenylharnstoff und 0,5 g Aldehyd werden in 50 ccm Alkohol gelöst und in die Lösung unter Eiskühlung trockener Chlorwasserstoff eingeleitet. Dabei schlägt die Farbe der Lösung in Orangerot um. Beim langsamen Eindunsten scheiden sich aus ihr prachtvoll glänzende orange gefärbte monokline Kristalle ab, die nach dem Absaugen und Trocknen bei 206° unter Zersetzung schmelzen.

N-Bestimmung: 3,095 mg, 0,378 ccm N_2, 24°, 748 mm Hg.

HCl-Bestimmung: 0,1937 g verbrauchen 6.36 ccm n/10 $AgNO_3$ (Titration nach *Volhard*).

Berechnet für $C_{16}H_{17}N_3O.HCl$ . . N 13,84 Proz., HCl 12,01 Proz.
Gefunden . . . . N 13,82 „ HCl 11,98 „

Auch vom Thioharnstoff konnte in salzsaurer Lösung auf die gleiche Weise eine orange gefärbte kristallisierte Verbindung erhalten werden. Die Unmöglichkeit der Umkristallisation und die ungünstigen Löslichkeitsverhältnisse des Thioharnstoffs führten jedoch zu keinem analysenreinen Produkte — die Stickstoffwerte lagen stets 1 Proz. zu hoch —, so daß auf dieses Thioureid nicht näher eingegangen werden soll. Bemerkenswert ist, daß bei dem Versuche der Chlorbestimmung nach *Volhard* in salpetersaurer Lösung neben dem Chlor der gesamte Thioharnstoff als Silberverbindung niedergeschlagen wird[1]).

II.

Die mit Harnstoff und Thioharnstoff, sowie mit einfach alkylierten Harnstoffen erhaltenen Färbungen legten den Gedanken nahe, die Reaktion zum einfachen Nachweis der Gruppe $.CO.NH_2$ bzw. $.CS.NH_2$ heranziehen zu können. Darauf gerichtete systematische Untersuchungen ergaben jedoch kein eindeutiges Resultat. Bei einfachen Säureamiden, wie dem Formamid und Acetamid, tritt keinerlei Farbreaktion mit dem *Ehrlich*schen Aldehyd auf. Auch bei monosubstituierten Harnstoffen mit längerer Kette, wie dem α-Bromdiäthylharnstoff (Adalin) und dem α-Brom- und α-Jodisovalerylharnstoff (Bromural bzw. Jodival), sowie bei dem asymmetrischen Dimethylharnstoff wird eine Kondensation unter Farbbildung vermißt. Positive, allerdings schwächere Gelbgrünfärbung als Harnstoff zeigen das Biuret und Allantoin. Auch der von *Fromm* und *Honold* (7) erstmals aus Äthylenchlorhydrin und Natriumcyanamid dargestellte, von mir mit *Frieder* näher untersuchte ringförmige Äthylenpseudoharnstoff zeigt ausgesprochene gelbe Farbreaktion. Symmetrische disubstituierte Harnstoffe und Säureureide, wie die Parabansäure und die Barbitursäure geben, wie zu erwarten war, keine mit Färbung einhergehende Kondensation. Ebenso lassen

---

[1]) Herrn Dr. *Paul Fantl* und Herrn Dr. *Adolf Friedrich* bin ich für die Unterstützung bei der Ausführung der Mikroanalysen zu Dank verpflichtet.

sämtliche untersuchten Purin- und Guanidinabkömmlinge: Harnsäure, Xanthin, Hypoxanthin, Guanin, Sarkosin, Alloxan, Alloxanthin, Guanidin, Kreatin, Kreatinin die Farbbildung mit dem Aldehyd vermissen. Von Aminosäuren geben Glykokoll und Alanin eine eben angedeutete Gelbfärbung, alle übrigen untersuchten Aminosäuren: Leucin, Phenylalanin, Tyrosin, Cystin, Asparaginsäure und Glutaminsäure ergeben ein negatives Resultat. Asparagin und Glutamin dagegen zeigen nach einiger Zeit eine deutliche Orangefärbung mit dem *Ehrlich*schen Reagens. Bemerkenswerterweise gibt auch Glutaminsäureester nach einigem Stehen eine intensive Gelbfärbung. Eine eigenartige Farbreaktion tritt beim Versetzen einer Lösung von Glykochollsäure mit dem Aldehydreagens auf. Beim ersten Zusatz entsteht eine grünblaue Färbung, die jedoch fast augenblicklich verschwindet.

III.

Bereits in der ersten Mitteilung wurde auf die praktische Bedeutung der neuen Harnstoffreaktion für den qualitativen Nachweis vermehrten Reststickstoffs im Serum hingewiesen. Systematische Untersuchungen hatten uns gezeigt, daß die Reaktion in Trichloressigsäurefiltrat des Serums im Gegensatz zu reinen Harnstofflösungen, deren Empfindlichkeitsgrenze bei 6 mg-Proz. gefunden wurde, erst bei einem Reststickstoffgehalt von über 36 bis 40 mg-Proz., entsprechend rund 20 mg-Proz. Harnstoff, positiv gefunden wird, und daß die Intensität der Färbungen einen annähernd richtigen Schluß auf die Größe des Harnstoffgehaltes und somit der Reststickstoffvermehrung gestattet. Die beobachteten Farbreaktionen mit einzelnen Aminosäuren sind, von dem geringen Anteil der Aminosäuren am Gesamtreststickstoff abgesehen, so schwach, daß sie praktisch nicht ins Gewicht fallen. Fortlaufende Nachprüfungen der Reaktion im Serum an dem reichen Material des medizinisch-chemischen Instituts, die ich nun durch länger als ein Jahr durchgeführt habe, bestätigen ausnahmslos diese Tatsache. In jüngster Zeit wurden unsere Befunde durch *Burghardt* (8) aus der Klinik *Friedrich Müllers* in München, der über ein Material von über 50 Fällen berichtet, durchweg bestätigt und die praktische Bedeutung der Reaktion für die rasche Diagnose vermehrten Reststickstoffs hervorgehoben.

Die Reindarstellung des der Reaktion zugrunde liegenden Ureids und die relativ einfache Darstellung der salzsauren bzw. schwefelsauren Verbindung erweckte auch die Hoffnung, eine exakte, klinisch brauchbare kolorimetrische Bestimmung des Harnstoffs ausbauen zu können. Diese Aufgabe erschien um so verlockender, als eine rasch auszuführende, exakte Harnstoffbestimmung für die Klinik heute noch fehlt. Die Eigenschaften der neuen Harnstoffverbindung er-

mutigten allerdings von vornherein wenig zu solchen Versuchen. Einmal ist die auftretende Gelbgrünfärbung zur Kolorimetrie wenig geeignet und erfordert jedenfalls ein sehr geübtes Auge. Dieser Übelstand hätte sich noch durch die Zwischenschaltung farbiger Schirme beheben lassen. Viel schwerwiegender aber ist die bereits mehrfach hervorgehobene weitgehende hydrolytische Spaltung des Ureids in seinen Lösungen und ihre Abhängigkeit von der $H^{\cdot}$-Ionenkonzentration. Da das salzsaure Ureid ungemein leicht zur Spaltung neigt, wurde zu den Versuchen die schwefelsaure Verbindung verwendet. Da sämtliche Versuche gleichsinnig ausfielen, soll hier nur einer näher beschrieben werden.

Als Standardlösung diente eine Lösung von genau 1 g des schwefelsauren Ureids, entsprechend 208 mg Harnstoff in 100 ccm m/10 Schwefelsäure. Als Vergleichslösung wurde eine genau m/10 Harnstofflösung verwendet, von der je 10 ccm mit je 15 ccm einer 1 proz. Aldehydlösung in verdünnter Schwefelsäure kondensiert und a) auf 25, b) auf 50 und c) auf 100 ccm in Meßkolben aufgefüllt wurde. Die Säurekonzentration in den einzelnen Kolben war rund 0,1 m, 0,06 m und 0,03 m. Untersucht wurde in einem *Duboscq*schen Kolorimeter.

Bei einer Einstellung der Standardlösung z. B. auf 10 wurde für die Lösung a) Farbengleichheit bei einem Stande des Prismas bei 7,5 (Mittel von zehn Ablesungen), für b) bei 28,8, für c) bei 59,2 abgelesen. Berechnet man nach der Formel $c_1 = \frac{c_2 h_2}{h_1}$ die Konzentration der untersuchten Lösungen, so zeigt sich, daß die gefundenen Werte von den theoretisch geforderten um derartige Beträge nach oben und unten abweichen, daß sie als gänzlich unbrauchbar gelten müssen. Am günstigsten liegen die Verhältnisse noch bei Lösung b) mit einem Säuregehalt von 0,06 m, bei der sich 144,5 mg-Proz. berechnen, rund 20 Proz. zu hoch. Lösung a) und c) mit einem Säuregehalt von 0,1 m bzw. 0,03 m ergeben Werte, die von den theoretischen um rund 50 Proz. differieren — für a) 113,2 mg-Proz. statt 240 mg-Proz., für c) 34,5 mg-Proz. statt 60 mg-Proz.

Wie sehr die Stärke der Färbung von der Säurekonzentration abhängt, möge eine Versuchsreihe veranschaulichen, in der bei gleichem Volumen, gleicher Harnstoff- und Aldehydmenge die Säurekonzentration variiert wurde. Je 1 ccm m/10 Harnstofflösung und 2 ccm 1 proz. Aldehydlösung wurden in gleichweiten Reagenzgläschen mit verdünnter Schwefelsäure von 0,5 bis 12 ccm aufsteigend versetzt und in allen Gläsern das Volumen mit destilliertem Wasser auf 15 ccm ergänzt. Die Säurekonzentration wurde in jedem Röhrchen nachträglich durch Titration ermittelt. Es ließ sich in dieser Reihe ein Ansteigen und Wiederabklingen der Intensität der Farbreaktion mit

einem deutlichen Maximum erkennen. Die intensivste Färbung wurde bei einer Säurekonzentration von m/10 gefunden. Die Lösungen mit 0,03 m und 1,5 m Säuregehalt zeigten die gleiche Färbung; bei einer 3 m entsprechenden Säurekonzentration war gegenüber der Kontrolle — 2 ccm Aldehydreagens auf 15 ccm mit Wasser aufgefüllt — kein Unterschied der Färbung zu erkennen. Es bestätigt das die bereits erwähnte Tatsache, daß durch zu hohe Säurekonzentration die Kondensation verhindert wird. In dieser Abhängigkeit von der Säurekonzentration ist aber auch die Erklärung für die in der ersten Mitteilung bereits hervorgehobene Differenz im Verhalten des Trichloressigsäurefiltrats des Serums gegen reine Harnstofflösungen zu suchen.

Versuche mit wechselnden Harnstoffmengen bei gleichbleibender Säurekonzentration führten in gleicher Weise zu negativen Ergebnissen. Aus allen Untersuchungen geht eindeutig hervor, daß eine exakte kolorimetrische Bestimmung sich nicht durchführen läßt, schon weil eine prinzipielle Forderung jeder Kolorimetrie, die gleichmäßige Beschaffenheit der gelösten Substanz bei wechselnder Konzentration nicht erfüllt ist. Dieser Forderung konnten auch Versuche, die hydrolytische Spaltung durch Verwendung von Alkohol als Lösungs- bzw. Fällungsmittel zurückzudrängen, nicht gerecht werden. Inwieweit die von *Burghardt* (l. c.) empfohlene Enteiweißung des Serums mit Uranylacetat und Verwendung von Ferrocyankalium als Vergleichslösung zu brauchbaren Resultaten führt, müssen Nachprüfungen seiner Angaben zeigen. Theoretisch läßt sich gegen seine Methode der gleiche prinzipielle Einwand erheben wie gegen alle kolorimetrischen Methoden, die von der zu untersuchenden Lösung verschiedene Testlösungen verwenden. Für die Klinik ist dort, wo es auf exakte Werte ankommt, der Mikrokjeldahl nach *Pregl* für die Reststickstoffbestimmung heute die beste und dabei einfachste Methode. Für orientierende Untersuchungen und für den praktischen Arzt ist die einfache qualitative Prüfung, wie wir sie in unserer ersten Mitteilung angegeben haben, vollkommen ausreichend und zuverlässig.

Literatur.

1) *H. Schiff*, Liebigs Ann. **151**, 186; **189**, 157. — 2) *Derselbe*, Ber. **10**, 773. — 3) *Lüdy*, Monatsh. **10**, 295. — 4) *Barrenscheen* und *Weltmann*, diese Zeitschr. **131**, 591. — 5) *H. Weil*, Ber. **27**, 3316. — 6) *Möhlau*, ebendaselbst **31**, 2250. — 7) *Fromm* und *Honold*, ebendaselbst **55**. — 8) *Burghard*, Münch. med. Wochenschr. 1923, Nr. 20, S. 632.

Sind pankreasdiabetische Lebern adrenalinempfindlich?

Von

E. J. Lesser und **K. Zipf.**

(Aus dem Laboratorium der städtischen Krankenanstalten in Mannheim.)

(Eingegangen am 21. Juni 1923.)

Es ist in einer früheren Abhandlung gezeigt worden[1]), daß während der Monate August bis Februar die herausgeschnittene Leber pankreasdiabetischer Frösche in 4 Stunden bei 22^0 etwa die dreifache Menge Glykogen hydrolysiert wie die von normalen Tieren stammende. Ebenso bildeten Lebern pankreasdiabetischer Frösche erheblich mehr Zucker als normale Lebern, wenn sie nach der Methode von *Fröhlich* und *Pollack* mit Ringerlösung durchströmt wurden. Die ursprünglich von *Fröhlich* und *Pollack* verwendete Methode bedarf, wie früher auseinandergesetzt worden ist[2]), einer Modifikation insofern, als *Fröhlich* und *Pollack* die Froschleber mit zu großen Flüssigkeitsmengen durchströmt haben. Es wurden daher jetzt einige Versuche im Oktober angestellt, bei denen pankreasdiabetische Lebern nach der früher beschriebenen Modifikation der Methode von *Fröhlich* und *Pollack* durchströmt wurden. Diese Versuche sind in Tabelle I zusammengestellt; alle benutzten Frösche waren am 5. Oktober 1922 gefangen.

Aus der Tabelle ist zu ersehen, daß die Lebern von Tieren, denen vor 2 Tagen das Pankreas exstirpiert war, zwischen 1800 und 3200 mg Traubenzucker pro 100 g Leber und 4 Stunden bei Zimmertemperatur gebildet haben, während die normale Leber 650 mg bildete. Vergleicht man nur die beiden ersten Stunden der Durchströmung, so findet man für die Normallebern 224 mg (Mittel aus zwei Versuchen), für die pankreasdiabetischen Lebern 1358 mg (Mittel aus drei Versuchen). Es handelt sich also um eine Erhöhung der Geschwindigkeit der Zuckerbildung auf das Vier- bis Sechsfache, welche durch vorherige Pankreasexstirpation bewirkt wird. Dabei ist der Verlauf der Zuckerkurve nahezu geradlinig, nur in der vierten Stunde macht sich ein geringes Absinken der Zuckerwerte bemerkbar. Wir haben nun nachgesehen,

---

[1]) *E. J. Lesser*, diese Zeitschr. **108**, 1, 1920.
[2]) *Derselbe*, ebendaselbst **119**, 108, 1921.

Tabelle I.

Datum	Geschlecht, Gewicht, Temperatur	Lebergewicht g	Traubenzucker in mg pro 100 g Leber 1 Std.	2 Std.	3 Std.	4 Std.	Trockensubstanz der Leber Proz.	Durchströmungsflüssigkeit	Bemerkungen
17. X. 22	♂, 68 g, 19,0°	4,32	201	113	128	208	26,17	0,76 proz. NaCl	Normalversuch
19. X.	♂, 57 g, 18,5°	2,72	669	678	645	540	29,66	0,78 proz. NaCl	Vor 48 Std. Pankreasexstirpation
23. X.	♂, 71 g, 18,0°	3,57	1147	657	658	794	28,0	1 bis 2 Std. 0,78 proz. NaCl 3 bis 4 Std. 0,78 proz. NaCl + 1:500000 *Adrenalin*	Vor 48 Std. Pankreasexstirpation
25. X.	♂, 52 g, 17,5°	3,01	193	141	501	420	27,24	1 bis 2 Std. 0,79 proz. NaCl 3 bis 4 Std. 0,79 proz. NaCl + 1:500000 *Adrenalin*	
30. X.	♂, 72 g, 18,0°	2,98	439	482	458	396	27,18	1 bis 2 Std. 0,79 proz. NaCl 3 bis 4 Std. 0,79 proz. NaCl + 1:500000 *Adrenalin*	Vor zwei Tagen Pankreasexstirpation

ob sich bei Einwirkenlassen von Adrenalin in der dritten und vierten Stunde auch an der pankreasdiabetischen Leber noch eine Steigerung der Zuckerbildung erzielen läßt. Dies ist, wie aus der Tabelle hervorgeht, nicht der Fall. In den beiden Versuchen, in welchen wir auf die pankreasdiabetische Leber in der dritten und vierten Stunde der Durchströmung Adrenalin einwirken ließen, änderte sich die Zuckerbildung nicht. In einem Versuche (23. Oktober) tritt in der vierten Stunde (das ist die zweite Stunde der Einwirkung des Adrenalins) eine geringe Steigerung der Zuckerbildung ein (20 Proz.), die zu gering ist, um als Adrenalinwirkung angesprochen zu werden. Ein am 25. Oktober angestellter Kontrollversuch, bei dem in der dritten und vierten Stunde Adrenalin durch eine normale Leber lief, zeigt die gewöhnliche starke Erhöhung der Zuckerbildung in der ersten Adrenalin- = dritten Durchströmungsstunde (Anwachsen auf über das Dreifache des Zuckerwertes der zweiten Durchströmungsstunde). Das Ergebnis ist mithin, daß herausgeschnittene pankreasdiabetische Froschlebern, welche eine Erhöhung der Zuckerbildung auf das Vier- bis Sechsfache der normalen aufweisen, durch Adrenalin nicht mehr in ihrer Zuckerbildung gesteigert werden können.

Wenn wir die in der vorhergehenden Abhandlung dargestellte Theorie der Zuckerbildung in der Froschleber auf die herausgeschnittene pankreasdiabetische, durch Adrenalin nicht mehr beeinflußbare Froschleber anwenden, so kommen wir zu folgender Schlußfolgerung: In

einer Leber, der das Pankreashormon fehlt, gibt es keine adsorbierte und darum unwirksame Diastase mehr, darum läßt sich durch Adrenalin an einer solchen Leber keine Steigerung der Zuckerbildung mehr hervorrufen. Daraus folgt weiter: Das Hormon des Pankreas wirkt, indem es die adsorbierte (unwirksame) Diastase auf Kosten der „gelösten" (wirksamen) vermehrt und so die Geschwindigkeit der Zuckerbildung in der Leber herabsetzt. Daß dem wirklich so ist, beweist eine Arbeit von *Banting*, *Best*, *Collip*, *Macleod* und *Noble*[1]), in welcher unter anderem gezeigt wird, daß die Ätherwirkung, welche am Kaninchen Hyperglykämie erzeugt, durch Injektion von Pankreashormon (Insulin) gehemmt und aufgehoben werden kann. Die Autoren haben die Bedeutung dieser Tatsache sofort erkannt und darüber wörtlich gesagt (a. a. O., S. 578): „Die Tatsache, daß Insulin die Ätherhyperglykämie verhindert, ... bietet große Möglichkeiten, den Mechanismus der physiologischen Wirksamkeit des Insulins exakt zu bestimmen". Es ist in der vorausgehenden Abhandlung gezeigt worden, daß die Ätherhyperglykämie zur Klasse der Hyperglykämien gehört, welche durch oberflächenaktive Substanzen hervorgerufen werden, indem diese adsorbierte Leberdiastase aus der Adsorption verdrängen und damit wirksam werden lassen. Da das Insulin die Ätherwirkung aufhebt, muß es also die Adsorption der Diastase in der Leber so stark vermehren, daß die Verdrängung aus der Adsorption durch Äther keine Rolle mehr spielt. Eine weitere Folgerung ist, daß es gelingen muß, durch Insulin die Zuckerbildung der herausgeschnittenen pankreasdiabetischen Froschleber auf normale Werte herabzudrücken. Versuche, die allerdings erst im kommenden Herbst gemacht werden können.

Auf diese Weise erklärt sich auch die Hypoglykämie nach Insulin am Kaninchen in einfacher Weise. Sie entsteht dadurch, daß bei Insulininjektion die Adsorption der Leberdiastase so stark vermehrt wird, daß die Geschwindigkeit der Zuckerbildung in der Leber allmählich auf ein Minimum herabgedrückt wird. Da der Blutzucker trotzdem in die Organe abwandert, so muß es zur Hypoglykämie kommen.

Zusammenfassung.

Es wird gezeigt, daß herausgeschnittene pankreasdiabetische Froschlebern bei Durchströmung mit physiologischer Kochsalzlösung vier- bis sechsmal soviel Zucker bilden als Lebern, welche von nicht operierten Tieren stammen (Versuchsdauer 4 Stunden, Versuchstemperatur 18 bis 19°, Versuchsmonat Oktober). Adrenalin steigert

[1]) Amer. Journ. of physiol. **62**, Nr. 3, S. 559–580, 1922.

in Dosen, welche die normale Zuckerbildung um das Dreifache steigern, die Zuckerbildung von pankreasdiabetischen Lebern nicht mehr. Daraus wird geschlossen, daß in der pankreasdiabetischen Leber keine adsorbierte Diastase, sondern nur gelöste vorhanden ist. Dem Pankreashormon (Insulin) kommt daher die Fähigkeit zu, die Adsorption der Diastase in der Leberzelle zu ermöglichen. Die Menge der adsorbierten Diastase ist abhängig von der Insulinmenge in der Leber. Daher ist es möglich, durch Insulin die Verdrängung von Diastase aus der Adsorption durch oberflächenaktive Körper zu verhindern (Versuche von *Banting*, *Best*, *Collip*, *Macleod* und *Noble* über Verhinderung der Ätherhyperglykämie am Kaninchen durch Injektion von Insulin).

Die Beeinflussung der Zuckerbildung der Froschleber durch homologe Alkohole.

Von

E. J. Lesser und K. Zipf.

(Aus dem Laboratorium der städtischen Krankenanstalten in Mannheim.)

(Eingegangen am 21. Juni 1923.)

Frühere Versuche haben ergeben[1]), daß die Erhöhung der Geschwindigkeit der Zuckerbildung aus dem Glykogen durch die Diastase in der Leberzelle des Frosches auf zweierlei Art bewirkt werden kann: die eine wird durch die Verschiebung der Gewebsreaktion nach der saureren Seite hin erhalten. Die Zuckerproduktion kann dabei um maximal 90 Proz. gesteigert werden, der zeitliche Verlauf der Zuckerproduktion in 4 Stunden (Zuckerkurve) bleibt aber derselbe (Maximum in der ersten, Minimum in der zweiten oder dritten Stunde). Die Zuckerkurve ist dabei also parallel mit sich selbst nach oben verschoben. Die zweite Art wird z. B. durch die Beeinflussung der Leber durch Adrenalin oder hypertonische Salzlösung bewirkt[2]). Dabei wird die Zuckerproduktion auf das Vier- bis Sechsfache erhöht und *die Zuckerkurve wird vollständig verändert.* Das Minimum liegt bei der Beeinflussung durch hypertonische Lösung in der ersten, das Maximum in der dritten Stunde. Läßt man diese Beeinflussung erst nach zweistündiger Durchspülung der Leber mit physiologischer Salzlösung auf die Leber wirken, so erhält man in der dritten und vierten Stunde ein ziemlich geradliniges Ansteigen der Zuckerkurve auf das Drei- bis Sechsfache der Normalwerte der zweiten Stunde. Daraus war geschlossen worden, daß die Einwirkungen der zweiten Methode an dem Mechanismus angreifen, welcher in der Zelle Glykogen und Diastase räumlich getrennt hält, während die erste Methode die Wirkungsbedingungen des diastatischen Ferments in der Zelle genau so wie im Reagenzglase ändert. Da die nach der zweiten Methode erhaltbaren Steigerungen dreimal so groß sind als die nach der ersten hervor-

---

[1]) *E. J. Lesser*, diese Zeitschr. **119**, 108, 1921.

[2]) Hierher gehört auch die Beeinflussung durch Pankreasexstirpation, worüber die folgende Abhandlung zu vergleichen ist.

gerufenen, kommt ihnen wahrscheinlich eine größere physiologische Bedeutung zu, zumal es zweifelhaft ist, ob eine so starke Verschiebung der Reaktion (von p_H 7,1 auf p_H 6,8) in der Leber in vivo vorkommt, während plötzliche Adrenalinausschüttungen aus der Nebenniere wohl als möglich angesehen werden dürfen.

Es entstand nunmehr die Aufgabe, über den Mechanismus der räumlichen Trennung von Glykogen und Diastase in der Leberzelle zu bestimmteren Vorstellungen zu kommen. Schon früher war die Vermutung ausgesprochen worden, daß ein Teil der Diastase in der Leberzelle unwirksam sei, weil er an Oberflächen der Zellstruktur adsorbiert sei. *Warburg*[1]) hat gezeigt, wie man solche Adsorptionsvorgänge in der Zelle nachweisen kann. Läßt man oberflächenaktive Stoffe homologer Reihen in isokapillaren Konzentrationen auf die Zelle wirken, so müssen chemische Geschwindigkeiten in der Zelle, die von Adsorptionsvorgängen abhängig sind, quantitativ in derselben Weise beeinflußt werden. Es handelt sich dabei nach *Warburg* um Verdrängung adsorbierter Stoffe von der adsorbierenden Fläche durch die oberflächenaktiven Pharmaka. Der Zellvorgang konnte von *Warburg* durch ein Tierkohlemodell abgebildet und nachgemacht werden. Für uns entstand also die Frage: erhöhen oberflächenaktive Stoffe homologer Reihen in isokapillarer Konzentration die Zuckerbildung der Froschleber in quantitativ vergleichbarer Weise und ist in diesem Falle der Vorgang am Modell nachzumachen?

Die Versuche wurden genau nach der in der Abhandlung dieser Zeitschrift **119**, 108, 1921 beschriebenen Methode angestellt.

I. Versuche an der Froschleber.

Durchströmt wurde stets mit 0,78proz. Kochsalzlösung. Nur die Zuckerbestimmung wurde modifiziert wegen der Anwesenheit verschiedener Alkohole in den Durchströmungsflüssigkeiten. Die durch die Froschleber durchgeströmte Lösung wurde gemessen, scharf zentrifugiert, von dem geringen Bodensatz roter Blutkörperchen abgehoben. Eine gemessene Menge der wasserklaren Lösung wurde nach dem Ansäuern mit Essigsäure in halbkugeliger Glasschale vorsichtig auf dem Wasserbade zur Trockne verdampft. Es wurde darauf achtgegeben, daß der Rückstand nach Verdampfen des Wassers sofort vom Wasserbade genommen wurde. Der Rückstand wurde mit Wasser auf bestimmtes Volumen aufgefüllt, klar filtriert und in aliquoter Menge die reduzierende Substanz nach der Mikromethode von *Michaelis*[2]) bestimmt. Zunächst wurde in fünf Normalversuchen die früher benutzte Quecksilbermethode mit der jetzigen verglichen. Es ergab sich im Mittel aus je 20 Bestimmungen eine Differenz von 3,8 Proz. (s. Tabelle I).

---

[1]) *Warburg*, Jahresbericht über die gesamte Physiologie, I, S. 136, 1923.

[2]) *Michaelis*, diese Zeitschr. **59**, 166, 1914.

Tabelle I.

Nr.	Hg-Methode	neue Methode
1	497	522
2	908	1028
3	973	966
4	1009	1038
5	633	619
Mittelwerte	804	835

Für die Zuckerbildung der unbeeinflußten Leber wurden diesmal höhere Werte erhalten als in früheren Versuchen. Im Mittel aus acht Versuchen in den Monaten August bis Februar bildeten 100 g Leber 765 mg Zucker in 4 Stunden, während das Mittel aus 14 früheren Versuchen dieser Jahreszeit 455 mg betragen hatte.

Zunächst wurden Versuche angestellt, in denen 4 Stunden lang dauernd mit 0,7proz. Kochsalzlösung durchströmt wurde, welcher Äthyl-, Propyl-, Butyl- oder Amylalkohol zugesetzt war. Wir setzten diese in denselben Mengenverhältnissen der Kochsalzlösung zu, welche nach *Warburg* eine 50proz. Atmungshemmung bei roten Blutkörperchen ergeben. Diese Lösungen erhöhten die Tropfenzahl im *Traube*schen Stalagmometer im Verhältnis von 100 : 138 bis 140. Nur der Propylalkohol erhöhte in der gewählten Menge die Tropfenzahl stärker, im Verhältnis von 100 : 156. Methylalkohol konnte nicht verwendet werden, er setzte in der von *Warburg* angegebenen Konzentration starke Veränderungen in der Leber, so daß die Durchströmung unmöglich wurde. Das Ergebnis dieser Versuche zeigt Tabelle II.

Die Tabelle II enthält die Mittelwerte aus fünf Normalversuchen, die im August und September angestellt wurden. Ferner vier Versuche von Ende September und Anfang Oktober mit den verschiedenen Alkoholen, endlich zwei Vergleichsversuche im Oktober, den einen mit hyper-, den anderen mit isotonischer Kochsalzlösung. In den Alkoholversuchen steigen die Gesamtzuckerwerte von 813 bzw. 650 mg Traubenzucker (Normalversuche mit isotonischer Kochsalzlösung) pro 100 g Leber und 4 Stunden auf 1460 bis 2544 mg. Sie betragen das Zwei- bis Dreifache der Normalversuche und sind von gleicher Größenordnung wie ein gleichzeitig angestellter Versuch mit Durchströmung mit hypertonischer Kochsalzlösung (1619 mg). Auch in früheren Jahren hatte Durchströmung mit hypertonischer Kochsalzlösung im Oktober nur eine Erhöhung im Verhältnis von 1 : 2,4 ergeben, während im Dezember und Januar die Erhöhung das Vierfache betrug. Ebenso wie bei der hypertonischen Durchströmung ist in den Alkoholversuchen die Zuckerkurve verändert. Das Maximum liegt mit Ausnahme des Propylalkoholversuches in der zweiten Stunde, während bei Durchströmung mit 0,7proz. Kochsalzlösung in der zweiten Stunde

stets das Minimum liegt. Mit Ausnahme des Versuches mit Butylalkohol sind die Werte für die gesamte Zuckerbildung einander sehr ähnlich (zwischen 1400 und 1800 mg). Die erheblich größere Steigerung in dem Versuche mit Butylalkohol ist wohl auf eine individuelle Abweichung der verwendeten Froschleber zurückzuführen, nicht etwa auf besondere Eigenschaften des Butylalkohols. Dies geht aus Versuchen hervor, die im Dezember angestellt wurden, bei denen zunächst 2 Stunden mit physiologischer Kochsalzlösung, dann 2 Stunden mit Kochsalzlösung, der die verschiedenen Alkohole zugesetzt waren, durchströmt wurde. In diesen Versuchen wurde der Propylalkoholzusatz so gewählt, daß auch hier eine isokapillare Lösung resultierte (Tropfenzahlvermehrung 100 : 141). Diese Art, die Beeinflussung auf die Leber einwirken zu lassen, bietet den Vorteil, daß die Beeinflussung an derselben Leber geprüft wird, welche auch den Normalwert liefert, während es bei den Versuchen, die in Tabelle II zusammengestellt sind, nötig ist, beeinflußte und unbeeinflußte Lebern zu vergleichen, wobei individuelle Verschiedenheiten gelegentlich störend wirken können. Die erhaltenen Werte und die Einzelheiten des Versuches zeigt die Tabelle III.

Die Tabelle III zeigt drei Alkoholversuche und zum Vergleich einen Normalversuch und einen Adrenalinversuch. Es ergibt sich, daß im Normalversuche sich die Zuckerwerte der beiden ersten Stunden zu den beiden folgenden verhalten wie 1 : 1,2. In den drei Alkoholversuchen verhalten sie sich wie 1 : 3, 1 : 2,6 und 1 : 3,8. Im Adrenalinversuche wie 1 : 3,5. Die Versuche ergeben mithin, daß isokapillare Lösungen von Äthyl-, Propyl-, Butyl- und Amylalkohol eine starke Beschleunigung der Zuckerbildung der Froschleber ergeben. Sie sind untereinander von ähnlicher Größenordnung und ebenso von ähnlicher Größenordnung wie bei Beeinflussung der Leberzelle durch Adrenalin oder hypertonische Kochsalzlösung. Die Wirkungsweise der Alkohole besteht darin, daß sie in der Leberzelle adsorbierte Diastase von Oberflächen der Zellstruktur verdrängen, so daß diese Diastase nunmehr mit dem Glykogen reagieren kann. War diese Deutung unserer Alkoholversuche richtig, so mußte es möglich sein, Modellversuche anzustellen, die in dem folgenden Absatz beschrieben sind.

II. Verdrängung adsorbierter Diastase von Tierkohle durch oberflächenaktive Stoffe.

Als diastatisches Ferment benutzen wir für die Modellversuche Froschblutserum von hungernden Winterfröschen. Diese haben einen außerordentlich konstanten Diastasegehalt im Blutserum. Das Froschblut tropfte aus dem angeschnittenen Herzen in gewogene isotonische Kochsalzlösung, die nachher wieder gewogen wurde, so daß bekannt war, wieviel Froschblut in 1 ccm der Lösung enthalten war. Dann wurde zentrifugiert,

Tabelle II.

Datum	Geschlecht, Gewicht u. Temperatur	Lebergewicht g	Traubenzucker in mg pro 100 g Leber				Durchströmungsflüssigkeit	Trockensubstanz der Leber	Bemerkungen
			1 Std.	2 Std.	3 Std.	4 Std.			
8. VIII. bis 22. IX. 1922	♂, 71 g, 20,5°	3,96	176	153	223	261	0,78 proz. NaCl	—	Mittelwert aus 5 Versuchen
28. IX. 1922	♂, 65 g, 19,5°	1,93	709	958	624	253	0,78 proz. NaCl + 1,4 ccm *Butylalkohol* pro 100 ccm	21,17 Proz.	$\frac{100\,z}{z_w} = 138$ (Tropfenzahl im *Traube*schen Stalagmometer.)
4. X. 1922	♂, 66 g, 19,5°	4,02	392	723	414	279	0,78 proz. NaCl + 0,5 ccm *Amylalkohol* pro 100 ccm	31,85 „	$\frac{100\,z}{z_w} = 140$
6. X. 1922	♂, 57 g, 19,5°	2,85	629	547	140	140	0,78 proz. NaCl + 5,6 ccm *Propylalkohol* pro 100 ccm	22,54 „	$\frac{100\,z}{z_w} = 156$
9. X. 1922	♂, 53 g, 19,5°	2,14	501	562	324	229	0,79 proz. NaCl + 9,2 ccm *Äthylalkohol* pro 100 ccm	23,47 „	$\frac{100\,z}{z_w} = 138$
13. X. 1922	♂, 34 g, 19,5°	1,37	431	432	477	279	2,4 proz. NaCl	22,58 „	—
17. X. 1922	♂, 68 g, 19,0°	4,32	201	113	128	208	0,76 proz. NaCl	26,17 „	—

Tabelle III.

Datum	Geschlecht, Gewicht und Temperatur	Lebergewicht frisch und Trockensubstanz	Traubenzucker in mg pro 100 g Leber				Durchströmungsflüssigkeit		
							1—2 Std.	3—4 Stunden	
			1 Std.	2 Std.	3 Std.	4 Std.		Zusammensetzung der Lösung	Tropfenzahl
11. XII. 1922	♂, 66 g, 18°	3,72 g 27,4 Proz.	187	160	157	253	0,77 proz. NaCl	0,77 proz. NaCl	$\frac{100\,z}{z_w} = 100$
13. XII. 1922	♂, 44 g, 18°	2,41 g 29,46 Proz.	203	169	**596**	**601**	0,78 proz. NaCl	0,78 proz. NaCl + 1,4 ccm *Butylalkohol* pro 100 ccm Lösung	$\frac{100\,z}{z_w} = 142$
18. XII. 1922	♂, 47 g, 18,5°	2,90 g 28,27 Proz.	243	183	**521**	**569**	0,78 proz. NaCl	0,78 proz. NaCl + 4,92 ccm *Propylalkohol* pro 100 ccm Flüssigkeit	$\frac{100\,z}{z_w} = 141$
8. III. 1923	♂, 46 g, 18°	2,76 g 28,0 Proz.	211	135	**632**	**681**	0,78 proz. NaCl	0,78 proz. NaCl + 9,2 ccm *Äthylalkohol* pro 100 ccm Flüssigkeit	$\frac{100\,z}{z_w} = 138$
6. III. 1923	♂, 50 g 18,5°	1,3 g 28,46 Proz.	349	212	**943**	**998**	0,78 proz. NaCl	0,78 proz. NaCl + 1 : 1000000 Adrenalin	—

von der klaren Lösung so viel für den Fermentversuch entnommen, wie 0,2 g Blut entsprach. In vier große Zentrifugengläser wurden alsdann je 100 mg *Merck*sche Tierkohle abgewogen. Zu den beiden ersten wurden je 5 ccm einer Lösung zugesetzt, welche in 110 ccm je 30 ccm der primären und sekundären Phosphatlösung nach *Soerensen* ($p_H = 6,8$) und 1,75 ccm einer 20proz. Kochsalzlösung enthielt. Zu den beiden anderen wurden je 5 ccm einer Lösung zugesetzt, welche in 110 ccm außer den gleichen Mengen Phosphat und Kochsalzlösung noch 1,54 ccm Butyl- oder 6,2 ccm Propylalkohol enthielt. In drei weitere Zentrifugengläser wurden je 5 ccm der Phosphatkochsalzlösung gegeben. Dann wurde zu sechs von den sieben Zentrifugengläsern eine Menge der Froschserumkochsalzlösung zugesetzt, welche 0,2 g Blut entsprach und 1 Stunde bei Zimmertemperatur stehengelassen. Dann kamen zu allen sieben Zentrifugengläsern je 5 ccm einer sterilen, etwa 2proz. Glykogenlösung. Sämtliche Gläser wurden dann für 6 bis 8 Stunden in den Brutschrank gestellt (37°), dann mit dem doppelten Volumen 96proz. Alkohols gefällt und nach ½tägigem Stehenlassen zentrifugiert. Der Alkohol wurde quantitativ abgegossen und der Rückstand noch zweimal mit 96proz. Alkohol auf der Zentrifuge gewaschen. Die vereinigten, ganz klaren Zentrifugate wurden im Wasserbade zur Trockne eingedampft, der Rückstand in Wasser gelöst und darin nach der Mikromethode von *Michaelis* die reduzierende Substanz bestimmt. In dem Zentrifugenglase, das nur Glykogen und Kochsalzphosphatlösung enthielt, ließ sich niemals reduzierende Substanz nachweisen. Das Ergebnis dieser Versuche zeigt Tabelle IV.

Tabelle IV.

Nr.	Aus Glykogen gebildeter Zucker in mg			
	ohne Tierkohle	mit Tierkohle	mit Tierkohle und Alkohol	
7	—	1,09	1,28	Butyl-alkohol
8	3,47	1,55	2,38	Butyl-alkohol
10	3,93	1,95	2,27	Butyl-alkohol
11	4,40	2,02	2,81	Propyl-alkohol
12	6,12	1,90	2,94	Propyl-alkohol
Mittelwerte aus 8 bis 12	4,48	1,86	2,60	

Sämtliche Zahlen der Tabelle IV sind die Mittelwerte aus je zwei Parallelversuchen, die stets gut übereinstimmten. Es ergibt sich, daß in allen Versuchen bei Gegenwart von Alkohol erheblich weniger Diastase von der Tierkohle adsorbiert wurde. Wenn wir die Diastasemengen den gefundenen Zuckerwerten direkt proportional setzen, so wurde durch die Tierkohle 59 Proz. der gesamten vorhandenen Diastase adsorbiert. Bei Gegenwart von Butyl- und Propylalkohol (in der gleichen Konzentration wie bei den Versuchen an der Froschleber) aber nur 42 Proz. Der Butylalkohol machte 29,5 Proz. der adsorbierten Diastase frei, der Propylalkohol 30 Proz. Die Zuckerbildung wird durch den Alkoholzusatz im Verhältnis 1 : 1,4 vermehrt. Wir haben also im Modellversuche im Prinzip den gleichen Vorgang wie an der Frosch-

leber, nur sind die quantitativen Verhältnisse andere, denn die Zuckerbildung wird durch den Alkoholzusatz nur im Verhältnis 1 : 1,4, nicht im Verhältnis 1 : 3 erhöht. Um eine solche Erhöhung zu erhalten, müßte man Bedingungen wählen, unter denen ohne Alkoholzusatz ein erheblich höherer Prozentsatz als 59 Proz. Diastase von der Tierkohle adsorbiert würde, was durch Variierung der Tierkohle- und Diastasemengen vielleicht möglich wäre. Uns kam es hier nur darauf an, daß sich im Prinzip der Zellvorgang am Modell nachahmen läßt. Endlich sind noch zwei Kontrollversuche zu erwähnen, der erste zeigt, daß bei Abwesenheit von Tierkohle Alkoholzusatz in der in diesen Versuchen gewählten Konzentration die Zuckerbildung nicht vermehrt, sondern um ein geringes vermindert. In Versuch 9 ließen wir Diastase auf Glykogen (ohne Tierkohle) einwirken, zweimal bei Gegenwart, zweimal bei Abwesenheit von Alkohol in der Kochsalzphosphatlösung. Es ergab sich, daß ohne Alkohol 1,01 mg Zucker gebildet wurde, mit Alkohol 0,95 mg. Endlich haben wir zu je 100 mg Tierkohle die gleiche Menge Dextrose zugesetzt (etwa 6 mg), einmal bei Gegenwart, einmal bei Abwesenheit von Alkohol in der Kochsalzphosphatlösung. Nach einstündigem Stehen bei Zimmertemperatur wurden dann die beiden Proben genau wie beim Fermentversuch behandelt. Es ergaben sich im Zentrifugat in beiden Proben die gleichen Dextrosemengen. Es hat also in den Fermentversuchen der Alkohol nicht dadurch gewirkt, daß bei Gegenwart von Alkohol weniger Dextrose von der Tierkohle adsorbiert worden ist.

III.

Das Ergebnis dieser Versuche ist, daß oberflächenaktive Stoffe darum zuckertreibend auf die Leber wirken, weil sie adsorbierte Diastase von der Adsorptionsfläche verdrängen und dadurch wirksam werden lassen. Die Erniedrigung der Oxydationsgeschwindigkeit in der Leberzelle, welche nach den Versuchen von *Warburg* und *Usui* gleichzeitig eingetreten sein muß, ist für die Geschwindigkeit der Zuckerbildung in der herausgeschnittenen Leber des Winterfrosches ohne Bedeutung. Zahlreiche frühere Versuche haben ergeben[1]), daß die Glykogenhydrolyse der herausgeschnittenen Winterleber sogar durch totale Anoxybiose nicht beschleunigt werden kann. Durch unsere Versuche ist auch der Mechanismus der Ätherhyperglykämie aufgeklärt. *Fröhlich* und *Pollack* haben gefunden[2]), daß Äther in 0,5 proz. Lösung wirkungslos, in 2 proz. Lösung dagegen zuckertreibend auf die Froschleber wirkt. Das ist eine Konzentration, welche unseren Alkoholkonzentrationen hinsichtlich der Erniedrigung der Oberflächenspannung sehr nahe liegt. Wir fanden,

---

[1]) *E. J. Lesser*, diese Zeitschr. **54**, 236, 1913.
[2]) *Fröhlich* und *Pollack*, Schmiedebergs Arch. **77**, 290, 1914.

daß eine Lösung, welche 3 ccm Äther in 100 Wasser enthielt, in unserem Stalagmometer eine Erhöhung der Tropfenzahl im Verhältnis von 100 : 132 ergab. Die Ätherwirkung in *Fröhlichs* und *Pollacks* Versuchen entspricht also ganz unseren Alkoholversuchen. Als oberflächenaktiver Stoff verdrängt der Äther genau wie die Alkohole adsorbierte Diastase von der Adsorptionsfläche und machte sie damit wirksam. *Fröhlich* und *Pollack* haben ferner festgestellt, daß Ergotoxin. phosphor. in 0,005proz. Lösung die zuckertreibende Wirkung des Äthers nicht aufhebt, während die zuckertreibende Wirkung des Adrenalins durch Ergotoxin aufgehoben wird. Sie haben daraus geschlossen, daß das Adrenalin auf den Endapparat des Sympathicus in der Leber wirkt, während die Ätherwirkung direkt an der Zelle angreift. Da nun aber eine Nervenerregung an und für sich auf den Vorgang der Zuckerbildung durch Diastase aus Glykogen nicht einwirken kann, so muß angenommen werden, daß durch die Nervenerregung eine Einwirkung auf die Diastase adsorbierenden Oberflächen in der Leberzelle stattfindet. Bei Erregung des sympathischen Endapparates werden sie verkleinert, solange die Erregung dauert. Dadurch geht adsorbierte Diastase in Lösung. Nach dem Abklingen der Nervenerregung kehren die adsorbierenden Oberflächen in den alten Zustand zurück und gelöste Diastase wird rückadsorbiert[1]).

Wir kennen nunmehr drei verschiedene Arten, wie die Zuckerbildung in der herausgeschnittenen Froschleber beschleunigt werden kann. 1. Verschiebung der Gewebsreaktion nach der saureren Seite bis auf p_H 6,8. Hier handelt es sich um eine Einwirkung auf die Diastase selbst, welche auch in vitro in gleicher Größenordnung erhalten werden kann. 2. Eine Erregung des sympathischen Endapparates durch das Adrenalin. Sie ist aufhebbar durch Ergotoxin. 3. Eine Einwirkung, welche am Mechanismus, der die räumliche Trennung von Glykogen und Diastase in der Leberzelle beherrscht, direkt angreift, indem sie die Oberfläche, welche zur Diastaseadsorption zur Verfügung steht, verkleinert. Dahin gehört a) Entquellung der Zellkolloide durch plötzliche Wasserentziehung, b) Verdrängung adsorbierter Diastase durch oberflächenaktive Pharmaka, c) Fehlen des Pankreashormons (s. folgende Abhandlung).

[1]) Auf die gleiche Weise kommt es bei der Reizung des motorischen Nerven zur Milchsäurebildung im Muskel, welche die Verkürzung der Muskelfaser bewirkt. Auch im Muskel sind milchsäurebildendes Ferment und Kohlehydrat räumlich getrennt, was durch Zerkleinerung des Muskels bewiesen werden kann (s. *E. J. Lesser*, Naturwissenschaften 1923, Heft 22, S. 422).

Über die Gärung der α-Keto-n-capronsäure.

Von

H. K. Sen.

(Aus dem Kaiser Wilhelm-Institut für experimentelle Therapie und Biochemie in Berlin-Dahlem.)

(Eingegangen am 21. Juni 1923.)

Das Ferment Carboxylase, das von *Neuberg* aufgefunden und von ihm und seinen Mitarbeitern eingehend untersucht worden ist, wirkt nicht nur auf die Brenztraubensäure ein, sondern auch auf deren Homologe sowie auf analoge Ketosäuren; z. B. werden die Oxy-brenztraubensäure[1]), die α-Keto-buttersäure[2]), die Methyl-äthyl-brenztraubensäure[3]), die Oxalessigsäure[4]), die α-Keto-glutarsäure[5]) ferner auch Ketosäuren der aromatischen Säuren zerlegt. Es handelt sich um regelrechte Vergärungen, bei denen Kohlendioxyd und primär die Aldehyde oder die Aldehydsäuren entstehen, die der einbasischen bzw. zweibasischen α-Ketosäure entsprechen. Das ursprüngliche Spaltungsprodukt kann jedoch sekundären Umwandlungen unterliegen, indem die Carbonylverbindungen in die zugehörigen Säuren oder Alkohole übergehen oder auch carboligatischem Aufbau dienen. So liefert die Vergärung der α-Ketoglutarsäure an Stelle der Aldehydbernsteinsäure die Bernsteinsäure selber, so geht aus der α-Ketobuttersäure neben dem Propionaldehyd Propylalkohol hervor, so entsteht aus Methyl-äthylbrenztraubensäure außer aktivem Valeraldehyd und linksdrehendem Amylalkohol auch l-Valeriansäure.

Die erwähnten Ketosäuren leiten sich zumeist von Aminosäuren ab, die in der Natur verbreitet sind, nämlich von dem Alanin, dem Serin, dem Isoleucin, der Asparaginsäure, der Glutaminsäure[6]). Es war nun von Interesse, festzustellen, wie eine Ketosäure sich verhält, die nicht

---

[1]) *Neuberg* und *Rosenthal*, diese Zeitschr. **61**, 171, 1914.

[2]) *Neuberg* und *Kerb*, ebendaselbst **47**, 413, 1912; **61**, 184, 1914.

[3]) *Neuberg* und *Peterson*, ebendaselbst **67**, 32, 1914.

[4]) *Neuberg* und *Karczag*, ebendaselbst **36**, 60, 1911.

[5]) *Neuberg* und *Ringer*, ebendaselbst **71**, 226, 1915.

[6]) Die zum Valin gehörige Dimethylbrenztraubensäure wird, wie ich fand, gleichfalls leicht und glatt carboxylatisch vergoren.

als ein den Organismen vertrautes Umwandlungsprodukt einer natürlich vorkommenden Aminosäure zu betrachten ist. Zwar findet sich die Angabe[1]), daß α-Amino-n-capronsäure seine Isomeren, das Leucin und Isoleucin, begleite, aber von einem regelmäßigen Auftreten der n-Aminocapronsäure unter den Bausteinen der Eiweißkörper kann nach unseren bisherigen Kenntnissen keine Rede sein. Die α-Keto-n-capronsäure verdient auch deshalb Beachtung, weil sie schon mehr den Charakter einer Fettsäure mittleren Molekulargewichtes besitzt, d. h. sich nicht unbegrenzt in Wasser löst und daher bezüglich der Oberflächenaktivität andere Verhältnisse darbietet als die leichter löslichen niederen Homologen.

Es zeigte sich nun, daß die *α-Keto-n-capronsäure von Hefe vergoren* wird. Die angedeuteten physikalischen Eigenschaften der Säure bedingen es wohl, daß die Substanz als freie Säure und von lebender Hefe nur unvollständig umgesetzt wurde. Löste man sie dagegen in Dinatriumphosphat, so wurde sie besser angegriffen. Das Phosphation spielt dabei als solches keine Rolle; von Belang ist nur der Umstand, daß sich die Säure in sekundärem Phosphat löst und das entstehende saure phosphorsaure Salz mit dem Ausgangsmaterial ein Puffersystem bildet. Wegen der offenbaren Schädigung der lebenden Hefezellen gelang die Vergärung sehr viel vollständiger mit Trockenhefen oder mit den aus ihnen bereiteten Mazerationssäften.

Mit Trockenhefen erreichte ich eine Decarboxylierung von *92 Proz.* und mit Hefesäften eine solche von rund zwei Dritteln der angewandten Substanzmenge.

Als Produkte der Spaltung wurden außer CO_2 n-Valeraldehyd und der zugehörige n-Amylalkohol erhalten; wesentliche Mengen von n-Valeriansäure habe ich nicht gefunden. Die Bildung des n-Amylalkohols glaube ich am besten durch „phytochemische Reduktion" erklären zu können. Die verschiedenen Valeraldehyde[2]) werden nämlich, wie *Neuberg* und Mitarbeiter gezeigt haben, von gärender Hefe leicht zu den zugehörigen Pentanolen reduziert; nach *Neuberg* und *Hirsch*[3]) ist es der bewegliche „Gärungswasserstoff", der für gewöhnlich die Hydrierung des intermediär auftretenden Acetaldehyds zum Weingeist vollzieht, aber bei Anwesenheit geeigneter Wasserstoffakzeptoren diese ergreift. Als Folge davon ist unter den Endprodukten der Gärung alsdann Acetaldehyd in vermehrter Menge nachzuweisen[3]); das ist auch

---

[1]) *Heckel*, M. **29**, 15, 1908; *Samec*, ebendaselbst **29**, **55**, **1908**; *Abderhalden* und *Weil*, H. 88, 272, 1913.

[2]) *Neuberg* und *Steenbock*, diese Zeitschr. **52**, **494**, **1913**; *Neuberg* und *Nord*, ebendaselbst **62**, 482, 1914; *Neuberg* und *Ringer*, ebendaselbst **90**, 388, 1918.

[3]) *Neuberg* und *Hirsch*, Ergebn. d. Phys. **21**, **433**, **1923**.

in meinen Versuchen der Fall gewesen, indem neben viel n-Valeraldehyd eine kleine Quantität Acetaldehyd zugegen war. Als Quelle desselben möchte ich die Kohlenhydrate der Hefe betrachten, die teils als Glykogen, zum Teil in anderer Gestalt vorhanden sind und sich nach den Untersuchungen von *Harden* und *Young*[1]), *Lebedew*[2]) sowie *Buchner* und *Meisenheimer*[3]) auch in Hefensäften vorfinden, und zwar in nicht unwesentlichen Mengen.

Jüngst haben nun *Neuberg* und *v. May*[4]) dargetan, daß man sekundäre Veränderungen des aus der α-Ketosäure durch Carboxylasewirkung gebildeten Aldehyds ausschließen kann, wenn man die Vergärung in Gegenwart von Sulfit bei einer geeigneten Wasserstoffionenkonzentration vornimmt, die man am besten in diesem Falle durch ein Gemisch von Natriumacetat + Essigsäure[5]) herstellt. Tatsächlich gelang es auch im Falle der Vergärung von α-Keto-n-capronsäure, mit diesem Hilfsmittel die Ausbeute an n-Valeraldehyd erheblich zu steigern und die an Amylalkohol herabzudrücken. Daß sich überhaupt etwas Amylalkohol bildet, findet wohl darin seine Erklärung, daß die Sulfit-Komplex-Verbindung der zu vergärenden α-Keto-n-capron säure nicht ganz beständig ist, sondern wie die Sulfitverbindung des zunächst erzeugten n-Valeraldehyds in gewissem Umfange der Dissoziation anheimfällt[5]). Derjenige Teil des n-Valeraldehyds, der in freiem Zustande auftritt, ist dann der phytochemischen Reduktion zugänglich.

Die Einzelheiten ergeben sich aus der Beschreibung der Versuchsanordnung und aus den experimentellen Ergebnissen. An dieser Stelle möchte ich nur noch betonen, daß die Gärung der α-Keto-n-capronsäure nicht allein glatt, sondern auch schnell vonstatten geht.

Die für die Versuche benötigte α-Keto-n-capronsäure wurde nach den Angaben von *Kondo*[6]) bereitet.

Versuch 1: 6 ccm m/5 α-Keto-n-capronsäure, 6 ccm Wasser und 1 g Trockenhefe (Patzenhofer) wurden zusammen kräftig durchgeschüttelt. Nach Einbringen von 10 ccm des Gemenges in ein Eudiometer wurden in 24 Stunden 5 ccm Kohlensäure entwickelt.

Versuch 2: Fügte man zu der Aufschwemmung von 1 g Trockenhefe in 6 ccm Wasser zuletzt 6 ccm m-Keto-n-capronsäure, so flockte die Hefe aus, und es kam zu keiner nennenswerten Kohlensäureproduktion.

---

[1]) *Harden* und *Young*, B. **37**, 1052, 1904.
[2]) *Lebedew*, diese Zeitschr. **20**, 114, 1909; **28**, 213, 1910.
[3]) *Buchner* und *Meisenheimer*, B. **39**, 3201, 1906.
[4]) *Neuberg* und *v. May*, diese Zeitschr. **140**, 299, 1923.
[5]) Siehe Ber. **52**, 1682, 1919; **53**, 462, 1920.
[6]) Diese Zeitschr. **38**, 407, 1912.

Versuch 3: 6 ccm der m/5 Ketosäure wurden mit 6 ccm m/5 Dinatrium-phosphatlösung und 1 g Trockenhefe versetzt. Nach 15 Minuten begann die Gärung. Diese lieferte mit 10 ccm der Mischung in 4 Stunden 9 ccm, innerhalb 24 Stunden 14,5 ccm und dann nach dem Einbringen in einen Thermostaten noch 4,3 ccm, also im ganzen 18,8 ccm CO_2.

Versuch 4: 1 g Trockenhefe mit 6 ccm der Phosphatlösung und 6 ccm Wasser ergab auch im Brutschrank keine Kohlensäure.

Versuch 5: 6 ccm m/5 Ketosäure, 6 ccm Dinatrium-phosphatlösung und 3 g Trockenhefe bildeten im Thermostaten innerhalb 24 Stunden 17 ccm Kohlendioxyd.

Versuch 6: In 18 ccm Mazerationssaft aus Patzenhofer Hefe wurden vorsichtig 0,13 ccm reine Ketosäure eingetragen; dabei trat eine deutliche Trübung ein. 17 ccm der Mischung wurden in ein Gasmeßrohr gebracht. Zunächst war die Kohlendioxydproduktion gering, nach 24 Stunden waren jedoch bei Zimmertemperatur 8,5 ccm CO_2 abgegeben.

Versuch 7: 18 ccm Mazerationssaft aus Patzenhofer Hefe, 5 ccm m/5 Dinatriumphosphat, 0,5 ccm Toluol und 0,13 ccm Ketosäure. Die Entwicklung von Kohlendioxyd setzte bald ein und betrug im Brutschrank innerhalb 48 Stunden 10,5 ccm Gas für 16 ccm der Mischung.

Versuch 8: Die Wiederholung desselben Versuches mit Saft aus Hefe Senst lieferte 17,6 ccm CO_2.

Versuch 9: Wie Nr. 8, nur mit dem Unterschiede, daß der Phosphatzusatz nach Zugabe der freien Säure geschah. Es erfolgte dabei eine Koagulation und eine Schädigung des Gärsystems, die sich darin ausdrückte, daß innerhalb 24 Stunden nur 3 ccm und innerhalb zweier Tage lediglich 5,4 ccm CO_2 frei wurden.

Versuch 10: Versuch wie Nr. 8 unter Zugabe von 1,5 ccm Toluol. Aus 15,5 ccm wurden in 24 Stunden bei Zimmertemperatur 12,5 ccm CO_2 erhalten.

Versuch 11: 18 ccm eines Saftes aus Sensthefe und 0,13 g α-Keto-n-capronsäure. 14 ccm des Gemisches kamen mit Toluol in die Eudiometerröhre; es entstanden 12,5 ccm CO_2.

Versuch 12: Wiederholung von Versuch 10 mit Saft aus Patzenhofer Hefe. Kohlensäuremenge 9,8 ccm.

Versuch 13: Wiederholung von Versuch 11 mit Patzenhofer Hefe. Ertrag 17 ccm CO_2.

Versuch 14: 0,13 g Ketosäure, 5 ccm Wasser, 5 ccm Phosphatlösung, 1 g Trockenhefe (Patzenhofer). 7 ccm und 0,5 ccm Toluol wurden in das Gärrohr eingeführt. Die Kohlensäureentwicklung begann fast augenblicklich. Nach 12 Stunden waren bereits 14,4 ccm CO_2 entstanden. Das entspricht einer *Decarboxylierung zu 92 Proz.* der Theorie.

Versuch 15: 0,13 g Ketosäure, 13 ccm Wasser, 1 ccm m-Dinatriumsulfit, 1 ccm Acetatpuffer sowie 2 g Trockenhefe. Von dem gut umgeschüttelten Gemenge wurden 13,5 ccm in das Eudiometer übergeführt. Die Reaktion setzte sofort ein und wurde nach 5 Minuten lebhaft. In 1½ Stunden waren bereits 14 ccm CO_2 entbunden (bei 20°). Der Ansatz kam in den Brutschrank, und über Nacht wurden im ganzen 16,5 ccm CO_2 frei.

Versuch 16: Kontrollversuch ohne die Ketosäure. Innerhalb 24 Stunden minimale Spur CO_2.

Versuch 17: Wiederholung von Versuch 15 bei Zimmertemperatur. Innerhalb 48 Stunden wurden 18,2 ccm CO_2 entwickelt.

In den Versuchen mit freier Säure oder mit dem Gemisch von freier Säure und Dinatriumphosphat gab sich das Auftreten von Valeraldehyd durch dessen charakteristischen Geruch ohne weiteres zu erkennen; bei den Ansätzen mit Sulfit dagegen war der Geruch schwach, da der Valeraldehyd zum allergrößten Teil an das schwefligsaure Salz gebunden war.

Versuch 18: 0,26 g der α-Keto-n-capronsäure wurden in 26 ccm Wasser gelöst und mit 2 ccm m-Dinatriumsulfitlösung, 2 ccm Acetatpuffer sowie 4 g Trockenhefe Patzenhofer versetzt.

Nach 24stündigem Stehen im Brutschrank wurde der Aldehyd in gewohnter Weise gemäß den Angaben von *Neuberg* und *Reinfurth* abdestilliert, wobei verdünnter reiner Alkohol als Vorlage diente. Die Menge des Destillats betrug 175 ccm. Hierin wurden gefunden 0,1321 g Valeraldehyd, gleich 70 Proz. der Theorie.

Versuch 19: Zu 0,26 g Ketosäure in 10 ccm Wasser wurden 10 ccm m/5 Dinatriumphosphat sowie 4 g Patzenhofer Hefe gefügt. Nach der Digestion wurde der n-Valeraldehyd abgeblasen. Von diesem wurden 28 Proz. der Theorie festgestellt.

Versuch 20: 5,2 g reine α-Keto-n-capronsäure wurden mit 520 ccm Wasser, 40 ccm m-Dinatriumsulfitlösung sowie 40 ccm Acetatpuffer nebst 80 g Trockenhefe Patzenhofer zusammengebracht. Die Gärung begann stürmisch. Nach 28stündiger Aufbewahrung im Brutschrank schritt ich zur Aufarbeitung. Das Gesamtvolumen betrug 660 ccm. 600 ccm wurden nach Neutralisation mit Soda und Behandlung mit Bariumchlorid in üblicher Art über Calciumcarbonat destilliert. Es gingen Öltropfen in reichlicher Menge über. Das gesamte Destillat wurde mit Äther ausgezogen und die ätherische Schicht alsdann mit Bisulfit ausgeschüttelt. Dabei schied sich die Doppelverbindung von schwefligsaurem Salz mit n-Valeraldehyd teilweise kristallinisch ab. Es war dreimalige Ausschüttelung mit Bisulfit erforderlich. Die ausgefallenen Kristalle wurden in Wasser gelöst, und dazu wurde

die wässerige Sulfitlösung gegeben. Das Gemenge wurde alsdann mit überschüssigem Calciumcarbonat destilliert. Es verflüchtigte sich eine stark nach Valeraldehyd riechende wässerige Flüssigkeit. Dieselbe zeigte eine mäßige Nitroprussidnatriumreaktion, die auf einen Gehalt an Acetaldehyd hinwies. Bei Zugabe von 5 g p-Nitro-phenylhydrazin in Essigsäure fiel ein Öl aus, das in wenigen Minuten beim Umrühren mit einem Glasstabe kristallinisch erstarrte. Nach 1½stündigem Stehen wurde die feste Masse abfiltriert und zuerst mit verdünnter Essigsäure und schließlich gründlich mit Wasser gewaschen. Die auf Tonscherben getrocknete Substanz wog 3,1 g, welche ohne weiteres bei 70° schmolz, während das reine n-Valeraldehyd-p-nitro-phenylhydrazon bei 73 bis 74° schmilzt. Dieser höhere Schmelzpunkt wurde auch nach einmaligem Umkristallisieren erhalten. Ausbeute und Schmelzpunkt des Rohproduktes lehren, daß Acetaldehyd höchstens in unbedeutenden Mengen vorhanden gewesen sein konnte.

0,0991 g Substanz: 16,7 ccm N_2 (19°, 759 mm).

$C_{11}H_{15}N_3O_2$. Ber. N = 19,00 Proz.; gef. N = 19,26 Proz.

In der mit Bisulfit ausgezogenen ätherischen Schicht mußte sich der n-Amylalkohol befinden. Zu seiner Isolierung wurde die ätherische Lösung zweimal mit Wasser gewaschen und mit Glaubersalz getrocknet. Nach dem Vertreiben des Äthers am Birektifikator hinterblieb ein Öl, das bei Destillation aus einem kleinen Kölbchen unter gewöhnlichem Druck 0,6 ccm konstant bei 138° siedenden n-Amylalkohols lieferte. Derselbe wies alle Eigenschaften auf, die dieser Verbindung zukommen.

Mit 60 ccm des Gärgutes wurde eine Aldehydtitration ausgeführt, die einen Gehalt von 86 Proz. Valeraldehyd anzeigte.

Versuch 21: Bei Anstellung eines Versuches mit 2,6 g Ketosäure, 100 ccm Wasser, 100 ccm m/5 Dinatriumphosphatlösung und 40 g Patzenhofer Hefe ergab sich nur eine Ausbeute von 18 Proz. Valeraldehyd, dafür aber mehr Amylalkohol, von dem 1,5 ccm isoliert werden konnten.

Diese Ausbeutenverhältnisse zeigen deutlich, daß eine Zugabe von sekundärem schwefligsaurem Salz die reine carboxylatische Spaltung begünstigt.

Bei der optischen Prüfung [im Halbmikroapparat nach *Neuberg*[1])] erwies sich der Amylalkohol stets als nicht drehend.

---

[1]) *Neuberg*, diese Zeitschr. 67, 102, 1914.

Die photodynamische Sensibilisierung der Protozoen und der Satz von Talbot.

Von

W. W. Efimoff.

(Aus dem biophysikalischen Institut zu Moskau.)

(Eingegangen am 21. Juni 1923.)

Die Beleuchtung mit hellem Sonnenlichte ist für die im Heuinfus oder Teichwasser vorhandenen Protozoen unschädlich. Bei Zusatz aber von fluoreszierenden Stoffen, z. B. Eosin, die im Sonnenspektrum Absorptionslinien aufweisen, zu den genannten Aufschwemmungen, gehen die Protozoen unter sonst gleichen Bedingungen schnell zugrunde. Diese Erscheinung wurde als photodynamisch oder Sensibilisierung bezeichnet, weil die fluoreszierenden Stoffe die lebende Zelle sensibilisieren, indem sie sie empfindlich für lange Lichtwellen machen.

Nach *Raab* (1), *Tappeiner* (2), *Metzner* (3), *Pincussen* (4) gehen fast alle pflanzlichen und tierischen Gewebe unter Einwirkung kleinster Mengen sensibilisierender Stoffe zugrunde. Im Dunkeln wurden die photodynamischen Erscheinungen nicht beobachtet.

Bei unseren Versuchen lebten und teilten sich Infusorien (Paramaecium caud.) in einer Eosinlösung bei Lichtabwesenheit im Laufe von 41 Tagen.

Da wir es bei der Sensibilisation augenscheinlich mit einer photochemischen Reaktion zu tun haben, so stellten wir uns die Aufgabe, die Anwendbarkeit des *Talbot*schen Gesetzes für diese Reaktion zu prüfen, das für viele photochemische Prozesse zutrifft, z. B. bei Entfärbung, für peripherisches Sehen [*Lasareff* (5)], für phototrope Erscheinungen bei Pflanzen [*Natanson* (6)] usw.

Den einfachsten Ausdruck für das *Talbot*sche Gesetz gab *Lasareff*: „Zur Gleichheit photochemischer Einwirkungen konstanten und flimmernden Lichtes ist Gleichheit der zugeführten Energie während der Änderungsperiode des Lichtes notwendig."

Bezeichnen wir nun die Lichtstärke mit „J" bei konstantem und „J_1" bei flimmerndem Lichte, die Beleuchtungsperiode bei ersterem durch „t", bei letzterem durch „t_1", so kann das Gesetz folgendermaßen ausgedrückt werden:

$$J\,t = J_1\,t_1.$$

Im Falle der Sensibilisierung von Protozoen wird das Gesetz dann zutreffen, wenn bei gleicher Menge zugeführter Energie die

Protozoen durch fluoreszierende Substanzen zu gleicher Zeit zugrunde gehen, sowohl bei flimmerndem, als auch bei konstantem Lichte.

Als Objekt der Sensibilisation dienten das Infusorium Paramaecium caudatum im üblichen Heuinfus. Letzterer wurde mit der Pipette entnommen und durch Eosinlösung derart auf das Doppelte verdünnt, daß die Konzentration das Verhältnis von 0,0005 g : 1 ccm besaß. Die Eosinlösung mit Infusorien wurde zu je 3 Tropfen (gleicher Größe) mit derselben Pipette auf zwei Glasplatten aufgetragen, die Vertiefungen besaßen.

Die Platten wurden alsdann umgedreht und wie ein Deckel über ein Gefäß mit Wasser gebracht.

Dadurch wurde Austrocknen der hängenden Tropfen verhindert, und die Eosinkonzentration blieb gleich. Oberhalb des Gefäßes befand sich eine 1000-Kerzen-Lampe, deren Lichtintensität mittels Rheostats nach einem Amperemeter reguliert wurde. Zwischen Lampe und Gefäß befand sich ein zweites Gefäß mit Wasser für die Wärmeabsorption. Ein Zylinder aus schwarzem Karton mit Öffnung nach unten umhüllte diese Einrichtung.

In einer Versuchsserie wurde die eine Platte fortwährend mit gleicher konstanter Lichtstärke, die andere Platte mit flimmerndem Lichte bestrahlt.

Da der Versuch verhältnismäßig lange dauerte, von 30 bis 100 Minuten, und das Objekt Paramaecium technische Schwierigkeiten für die Prüfung des *Talbot*schen Gesetzes darstellt, so wurden die Bestrahlungs- bzw. Verdunkelungsperioden viel größer genommen als von *V. Henri* (7), nämlich 2 bis 7 Minuten. Die Platten wurden periodisch mit der Lupe untersucht, die Expositionszeit dauerte 6 Sekunden. Es wurde die Unbeweglichkeit bei allen Infusorien konstatiert. Als Schluß der Reaktion wurde der Moment der vollständigen Unbeweglichkeit der Infusorien bezeichnet.

Da die Lichtstärke konstant war, so wechselte nur die Beleuchtungsperiode. Für die Platte, die mit flimmerndem Lichte bestrahlt wurde, war sie also kürzer. Damit letztere Platte die gleiche Energiemenge erhielt, mußte sie entsprechend längere Zeit bestrahlt werden. Damit das Gesetz $Jt = J_1 t_1$ sich hier geltend macht, sollte bei $J = J_1$ auch $t = t_1$, d. h. $\frac{t}{t_1} = 1$ sein.

Aus Tabelle I ersieht man, daß auf Platte Nr. 2, die mit konstantem Lichte beleuchtet wurde, alle Infusorien schon in 40 Minuten zugrunde gingen; Platte Nr. 1, die mit flimmerndem Lichte bestrahlt wurde, und zwar bei $4 \times 5 = 20$ minutiger Verdunkelung, wurde nach dem Tode sämtlicher Infusorien auf der Platte Nr. 2 noch entsprechende Zeit von $4 \times 5 = 20$ Minuten der Einwirkung konstanten Lichtes ausgesetzt, damit auch sie die gleiche Menge Energie empfing.

Tabelle I.

Protokoll vom 23. April 1922.

Zeit	Platte Nr. 1	Platte Nr. 2	Perioden der Belichtung und Verdunkelung	Stromstärke nach Amperemeter
8h 50′	Verdunkelung	Licht	5′	3,3
8 55	Licht	"	5	3,3
9 00	Verdunkelung	"	5	3,3
9 5	Licht	"	5	3,3
9 10	Verdunkelung	"	5	3,3
9 15	Licht	"	5	3,3
9 20	Verdunkelung	"	5	3,3
9 25	Licht	"	5	3,3
9 30	"	Alle Infusorien gehen zugrunde	—	3,3
9 35	"		—	3,3
9 40	"		—	3,3
9 45	"		—	3,3
9 48	Alle Infusorien gehen zugrunde			3,3

In 18 Minuten waren alle Infusorien auch hier tot. Eine Differenz von 2 Minuten spielt bei Versuchen mit Infusorien keine Rolle. In einer zweiten Serie von Versuchen wurden beide Platten der Einwirkung flimmernden Lichtes von wechselnder Stärke ausgesetzt.

Tabelle II bestätigt das Zutreffen des *Talbot*schen Gesetzes auch hier.

Wie angeführte Versuche zeigen, ist t/t_1 fast gleich 1; d. h. das *Talbot*sche Gesetz ist anwendbar bei photodynamischen Erscheinungen trotz der großen Beleuchtungs- bzw. Verdunkelungspausen. Wäre die photochemische Reaktion der Sensibilisation reversibel, so hätten wir während der Verdunkelung eine entgegengesetzte Richtung der Reaktion konstatieren können, und das *Talbot*sche Gesetz würde hier nicht gelten, folglich ist die Reaktion praktisch irreversibel.

Tabelle II.

Perioden in Minuten	Stromstärke Ampere	t-Zeit der Belichtung der Platte Nr. 1	t_1-Zeit der Belichtung der Platte Nr. 2	$\frac{t}{t_1}$
3	3,3	24	25	0,96
2	3,3	22	26	0,84
5	3,3	38	38	1,00
3	3,7	39	36	1,08
5	2,75	40	35	1,14
4	3,8	56	52	1,07
5	3,25	31	30	1,03
3	3,8	16	16	1,00
7	3,3	51	50	1,02
6	3,8	53	64	0,82
			Mittel . .	0,995

Schlußfolgerungen.

1. Das *Talbot*sche Gesetz trifft für die photodynamischen Erscheinungen bei Protozoen (mit Eosinzusatz) zu.

2. Diese Reaktion ist praktisch irreversibel.

Zum Schluß spreche ich Herrn Prof. Dr. *P. Lasareff* für die Anregung zu dieser Arbeit meinen tiefsten Dank aus.

Literatur.

1) *O. Raab*, Zeitschr. f. Biol. **8**, 1900; **44**, 1902. — 2) *H. Tappeiner* und *A. Jodlbauer*, Deutsch. Arch. f. klin. Med. **80**, 1904; *H. Tappeiner*, Ergebn. d. Physiol. 8, 1909. — 3) *P. Metzner*, diese Zeitschr. **118**, 1921. — 4) *L. Pincussen*, Ergebn. d. Physiol. **19**, 1921. — 5) *P. Lasareff*, Moskau 1918. — 6) *Nathanson*, Jahrb. f. wiss. Botanik 1908. — 7) *V. Henri*, Arch. d. scienc. Phys. 1918 (russisch).

Apparat zur Mikro-Ultrafiltration.

Von

Adolf Thiessen.

(Aus dem Institut für anorganische Chemie der Universität Göttingen.)

(Eingegangen am 21. Juni 1923.)

Mit 1 Abbildung im Text.

Anläßlich einer Untersuchung über den Kalkgehalt von Körperflüssigkeiten stellte sich die Notwendigkeit heraus, aus diesen die Eiweißkörper vollständig zu entfernen. Von einer Fällung mit chemischen Agenzien mußte abgesehen werden, um die Gleichgewichte der Lösungen in keiner Weise zu beeinflussen. Es lag demnach nahe, die Eiweißstoffe durch Ultrafiltration zu entfernen. Geeignetes Material an Ultrafiltern stand zur Verfügung in den „Ultrafeinfiltern" von *Zsigmondy*. Diese Filter sind in verschiedenen Porenweiten herstellbar; als Maß für den Durchmesser ihrer weitesten Öffnungen wurde von *Zsigmondy* ihre Durchlässigkeit für verschiedene reine Farbstoffe benutzt. Es hatte sich bei Filtrationsversuchen mit Blutserum ergeben, daß für Kongorot undurchlässige Ultrafeinfilter auch Eiweiß vollkommen zurückhielten. Die diesbezüglichen Versuche wurden mit größeren Mengen tierischen Blutserums angestellt. Die Filtration geschah in einem Druckluftfiltrationsapparat unter dem Druck von 40 bis 80 Atm., um eine möglichst große Filtrationsgeschwindigkeit zu erzielen. Die Ultrafiltrate wurden mit Hilfe der Biuretreaktion auf Eiweiß geprüft. Der stets negative Ausfall der Probe ließ auf praktisch vollkommene Abwesenheit von Eiweißstoffen im Ultrafiltrat schließen.

Als entsprechende Versuche angestellt werden sollten an Serum von menschlichem Blute, das zum Teil nur in sehr geringen Mengen zur Verfügung stand, ergab sich die Notwendigkeit, einen Ultrafiltrationsapparat für sehr kleine Mengen zu bauen. Um möglichst kurze Filtrationsdauer zu gewährleisten, mußte dieser Apparat gleichfalls für Filtration unter Druck eingerichtet sein. Als zweckmäßig und brauchbar ergab sich als Resultat vieler Versuche folgende Anordnung (s. Abbildung), die die am Ultrafiltrationsapparat nach *Zsigmondy*[1])

---

[1]) Zeitschr. f. angew. Chem. **26**, 447, 1913.

gemachten Erfahrungen und die von *Jander* daran angebrachten Verbesserungen verwerten konnte[1]).

Ein Trichtergefäß *b* aus starkem Jenaer Geräteglas trägt oben eine abgeschliffene Krempe *k*. Auf dieser liegt über einem Gummidichtungsring *d* die tellerförmig ausgedrehte, siebartig durchlochte Filterplatte *c*, deren plangedrehter Rand über einem zweiten Gummidichtungsring *e* mittels einer plangeschliffenen Krempe das Vorrats- und Druckgefäß *a* trägt. Dieses besteht gleichfalls aus starkem Jenaer Geräteglas und ist zur festen Verbindung mit dem Druckschlauch am Ansatzstück mit einer Olive versehen. Zusammengefaßt werden die genannten Teile durch zwei Klemmringe *g*, die wiederum durch drei Schrauben mit Flügelmuttern *h* aneinander gehalten und gegeneinander bewegt werden können. Die Krempen des Auffangtrichters und des Vorratsgefäßes ruhen in passenden Ausdrehungen der Klemmringe.

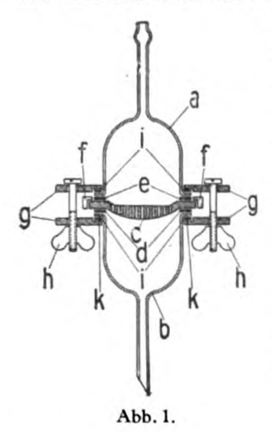


Abb. 1.

Um Beschädigungen des Glases beim Festziehen der Schrauben zu vermeiden, liegen zwischen den Klemmringen und den Glaskrempen federnde Gummiringe *i*. Das Herauspressen der Gummidichtung *e* durch den Druck im Innern des Gefäßes *a* wird verhindert durch einen Stufenring *f*, der auf der Filterplatte aufliegt und deren Rand zügig umfaßt, während seine innere Ausdrehung den Gummiring *e* eng umschließt. Auf diese Weise wird die Gummidichtung am Ausweichen verhindert und zugleich zentriert.

Das Zusammensetzen der Apparatur geschieht auf folgende Weise: In die ausgedrehten Stufen der beiden Klemmringe *g* werden die Gummiringe *i* hineingedrückt. Alle Dichtungsringe sind vor dem Gebrauch mit sehr wenig Vaseline leicht zu fetten[2]). Dann wird das Trichtergefäß *b* so in die Öffnung des einen Ringes eingeführt, daß die Krempe auf den Gummi zu liegen kommt. Auf die abgeschliffene Kante der Fläche wird jetzt ein Gummiring *d* aufgelegt und auf diesen die Filterplatte *c*, deren konvexe Krümmung nach unten gerichtet ist. In den Teller der Filterplatte wird dann zunächst ein gewöhnliches Papierfilter gelegt, das den siebartig gelochten Teil der Platte ganz bedecken muß. Der Rand der Filterplatte darf nicht vom Papierfilter bedeckt sein. Auf das angefeuchtete Fließpapier erst wird dann das Ultrafilter gelegt,

[1]) Die Apparatur wird hergestellt und vertrieben durch die „Verkaufsvereinigung Göttinger Werkstätten", Göttingen W 3, der der Verfasser auch für die Überlassung des Klischees verpflichtet ist.

[2]) Vielfach genügt bereits Anfeuchten der Gummiringe mit Wasser.

das auch den Rand der Platte bedecken und mit diesem gerade abschneiden soll. Nun wird der Zentrierring *f* so aufgelegt, daß er den äußeren Rand der Platte umfaßt; in die frei gelassene innere Ausdrehung wird der Gummiring *e* eingedrückt. Nun wird das Vorrats- und Druckgefäß *a* in entsprechender Weise wie vorher der Trichter *b* in den zweiten Klemmring eingeführt und mit der abgeschliffenen Krempe auf den Gummiring *e* gesetzt. Dabei ist darauf zu achten, daß die in die Ränder der Klemmringe eingefeilten Nuten übereinander stehen; nur in diesem Falle stehen nämlich die Löcher für die Aufnahme der Schrauben genau senkrecht übereinander. Nun werden die Schraubbolzen mit dem Gewinde nach unten in die Bohrungen der Klemmringe geführt und in die darunter gehaltenen Flügelmuttern eingeschraubt. Mittels eines Schraubenziehers werden bei festgehaltenen Flügelmuttern die drei Schrauben der Reihe nach festgezogen. Um Beschädigungen der Glaskrempen durch ungleichmäßiges Anziehen der Schrauben zu vermeiden, müssen diese sehr gleichmäßig festgezogen werden. Es ist daher nötig, eine einzelne Schraube erst nur um einen kleinen Betrag, anfangs um höchstens eine Drehung etwa, zu drehen. Darauf wird die nächste Schraube um den gleichen Betrag gedreht, und schließlich die letzte. Erst dann wird wieder die erste Schraube weiter angeholt und so fort. Mit zunehmendem Festziehen der Schrauben sind deren Drehungsbeträge immer kleiner zu wählen; zum Schluß sollen sie nur noch um Bruchteile einer Vierteldrehung gedreht werden. Dabei ist darauf zu achten, daß die Abstände der Klemmringe voneinander bei den verschiedenen Schrauben gleich sind, was mit einem Maßstabe, am besten mit der Schieblehre, leicht festzustellen ist.

Nach dem Zusammensetzen der Apparatur werden in das Druckgefäß *a* etwa 3 ccm Wasser gefüllt und der Schlauchansatz mit einem festen Druckschlauch verbunden, der mittels einer gut passenden Schlauchschelle festgehalten wird. Nun wird die Apparatur mit einem Tuche umwickelt, um bei etwaigem Zerspringen Verletzungen durch Splitter zu vermeiden, und langsam unter Druck gesetzt, indem aus einer Bombe durch ein Reduzierventil langsam Gas eingelassen wird. Der Druck darf bis auf 5 bis 6 Atm. gesteigert werden. Wird an einer Stelle Wasser aus dem Druckgefäß gepreßt, so ist an dieser Stelle, nachdem die Apparatur wieder unter normalen Druck gesetzt ist, die Schraube ein wenig fester anzuziehen und der Apparat erneut auf Dichtigkeit zu prüfen. Ist diese vollkommen erreicht, so wird das Wasser durch die zu filtrierende Substanz ersetzt und wie oben beschrieben erneut unter Druck gesetzt. Das Einfüllen der Substanz geschieht am besten mittels einer genügend langen Pipette mit dünn ausgezogenem Ausflußrohr, die in den Schlauchansatz des Druckgefäßes eingeführt wird.

Wird das Druckgefäß durch einen niedrigen zylindrischen Glasring mit plangeschliffener Krempe ersetzt, so kann der Apparat für Vakuumultrafiltration benutzt werden, wie der entsprechende große Apparat nach *Zsigmondy*[1]). In diesem Falle kann auf die obere Gummidichtung verzichtet werden. Die abgeschliffene Krempe wird dann einfach auf das Ultrafilter oder Membranfilter[2]) gesetzt. In dieser Form wurde der Apparat benutzt zur Filtration fein verteilter Niederschläge für quantitativ mikroanalytische Zwecke und bewährte sich dabei ausgezeichnet[3]).

Die Filterplatte kann, je nach dem Verwendungszweck, aus verzinntem Messing, Aluminium, säurefestem V_2A-Stahl oder Porzellan hergestellt werden. Die als Kugelsegment ausgebildete Unterseite der Filterplatte bewirkt, daß das Ultrafiltrat auch bei langsamer Filtration stets in der Mitte der Platte abtropft und nicht am Rande des Auffangtrichters abrinnt. Kapillares Eindringen des Filtrats in die unteren Dichtungsfugen und etwaiges Festhaften an diesen Stellen, das Verluste bedingen könnte, wird dadurch vermieden.

---

1) Zeitschr. f. angew. Chem. **26**, 447, 1913.

2) *Zsigmondy* und *Bachmann*, Zeitschr. f. anorg. u. allgem. Chem. **103**, 119, 1918.

3) *Thiessen*, Dissertation Göttingen 1923.

Eine Methode zur nephelometrischen Bestimmung kleinster Eiweißmengen.

Von

P. Rona und H. Kleinmann.

(Aus der chemischen Abteilung des Pathologischen Instituts der Universität, Charité Berlin.)

(Eingegangen am 21. Juni 1923.)

Mit 1 Abbildung im Text.

A. Einleitung.

Nephelometrische Bestimmungsmethoden sind bisher für die Phosphorsäure (1) und für Calcium (2) ausgearbeitet worden. Bei dem weiteren Ausbau der nephelometrischen Methode lag es nahe, den Versuch zu machen, ihr die Bestimmung von Eiweiß einzuordnen. Denn einmal war es wahrscheinlich, daß Eiweiß infolge der Größe seines Moleküls und seiner Neigung, in kolloidaler Form aufzutreten, nephelometrisch gut brauchbare homogene und dauerhafte Trübungen ergeben würde, und andererseits schien es, speziell im Hinblick auf das Studium peptischer Verdauung, wünschenswert, eine Methode zu besitzen, die schnelle und einfache Reihenversuche zur Bestimmung von Eiweißkonzentrationen ermöglicht.

Der Versuch, die Trübung, die eine Eiweißlösung mit einem eiweißfällenden Reagens liefert, zu analytischen Zwecken zu verwenden, ist bereits mehrfach gemacht worden. Doch ist er fast stets in Form einer Grenzbestimmung angestellt worden, d. h. es ist — speziell bei der Bestimmung von Pepsinmengen — diejenige Verdünnung eines wirksamen Ferments ermittelt worden, nach deren Einwirkung die als Substrat dienende Eiweißlösung gerade noch oder gerade nicht mehr eine Trübung mit einem eiweißfällenden Reagens liefert.

So verwendet *Jacoby-Solms* (3) die Trübung schwacher Ricinlösungen, *Fuld-Levison* (4) saure Lösungen von Edestin als Substrat und NaCl als Fällungsmittel, *Gross* (5) saure Lösungen von Casein und Natriumacetat als Fällungsmittel. *Michaelis* (6) ermittelt diejenige

Fermentverdünnung, die gerade Auflösung einer mit Sulfosalicylsäure aus Serum hergestellten Eiweißtrübung bewirkt.

Der Versuch nephelometrisch, d. h. aus dem Vergleich einer unbekannten Eiweißtrübung mit einer solchen bekannter Konzentration Eiweißmengen exakt analytisch zu messen, ist bisher zweimal gemacht worden. Von *Henri Bénard* und *Albert Laborde* (7) liegt eine kurze Mitteilung über nephelometrische Eiweißbestimmung vor, ohne daß irgend eine methodische Bearbeitung gegeben wäre.

Des weiteren ist von *Rusznyák* (8) eine Methode zur Bestimmung des Albumin-Globulinquotienten im Serum angegeben, die auf dem nephelometrischen Vergleich einer durch Neutralsalze hergestellten Gesamteiweißtrübung von Serum gegen eine Trübung, die aus demselben Serum nach Aussalzung und Abfiltration der Globuline hergestellt wird, beruht.

Diese Methode ist im Prinzip falsch. Ihr theoretischer Fehler beruht auf dem Vergleich zweier Trübungen, deren kolloider Zustand (Dispersität usw.) völlig verschieden ist, während zur nephelometrischen Ermittlung einer Konzentration, wie in früheren Arbeiten ausführlich gezeigt wurde, gerade die völlige Gleichheit aller kolloidchemischen Faktoren, wie Teilchengröße u. a., unbedingt notwendige Voraussetzung ist. *Rusznyák* vergleicht aber Trübungen, von denen die eine Albumine und Globuline, die andere nur Albumine enthält. Da nun Albumine und Globuline ein völlig verschiedenes kolloidales Verhalten aufweisen, ja gewissermaßen direkte Gegensätze bilden, so sind die verglichenen Trübungen völlig inkommensurabel. Dies zeigt sich auch, wie wir ersehen konnten, darin, daß Trübungen aus Albumin allein eine ganz andere Färbung im Nephelometer aufweisen als diejenigen, die aus Albumin und Globulin bestehen.

Zu diesem prinzipiellen Fehler kommt hinzu, daß Eiweißtrübungen, wie sie *Rusznyák* mit Neutralsalzen herstellt, völlig ungeeignet zur nephelometrischen Messung sind. Die Trübungen zeigen stets die Tendenz zu flocken. Es erscheinen kurze Zeit nach Herstellung der Trübung feine Fasern, die mit der Zeit zu größeren Flocken anwachsen und die Messung völlig ungenau gestalten. Es muß daher die Trübung, die aus Eiweißlösungen durch Einwirken von Neutralsalzen erzielt wird, als nicht geeignet für nephelometrische Untersuchungen bezeichnet werden.

Hieraus ergab sich für uns die Notwendigkeit, eine geeignete Reaktion und ihre Bedingungen zur Erzielung homogener und haltbarer Eiweißtrübungen zu suchen und auf ihrer Grundlage systematisch eine nephelometrische Eiweißbestimmungsmethode aufzubauen.

B. Herstellung einer nephelometrierbaren Eiweißtrübung.

Zur Herstellung einer haltbaren und völlig homogenen Eiweißtrübung, wie sie zur nephelometrischen Untersuchung notwendig ist, wurden systematisch die verschiedensten eiweißfällenden Reagenzien durchgeprobt. Als Eiweißlösung wurde wegen der leichten Beschaffbarkeit menschliches Blutserum benutzt, das mit physiologischer

Kochsalzlösung verdünnt wurde. Es wurden variierend starke Verdünnungen von Serum mit Salzlösungen, Phosphorwolframsäurelösungen, Ferrocyankaliumlösungen, Sulfosalicylsäurelösungen usw. versetzt. Alle angewandten Reagenzien erwiesen sich als ungeeignet, da sie stets starke Flockung bedingten. Am ehesten schien von allen untersuchten Reagenzien hinsichtlich Empfindlichkeit und Eignung der Reaktion die Sulfosalicylsäure verwendbar. Es wurde daher versucht, die Bedingungen der Eiweiß-Sulfosalicylsäurefällung zu variieren und sie durch Zusatz von Schutzkolloiden eventuell zu stabilisieren. Änderung der Azidität des Fällungsmediums von n/20 bis n/1 HCl hatte keinen sichtbaren Einfluß. Ebensowenig Zusätze von Kieselsäure und anderen Kolloiden. Glycerinzusatz schien die Flockung aufzuhalten, konnte ihren endgültigen Eintritt jedoch auch nicht verhindern.

Schließlich aber gelang es, nach zahlreichen Versuchen zu einer für nephelometrische Zwecke ganz hervorragend geeigneten Trübungsreaktion zu kommen.

Es zeigte sich, daß die Eiweißfällung durch Sulfosalicylsäure nicht in Form einer flockigen Abscheidung, sondern in Form einer völlig homogenen und stabilen Trübung auftritt, wenn nach positiver Aufladung der Eiweißteilchen durch sehr starken Säurezusatz ihre Ausfällung durch einen äußerst großen Sulfosalicylsäureüberschuß erzwungen wird.

Die zu diesen Vorversuchen angewandten Lösungen waren folgende. Als Eiweißlösung dienten 5 ccm einer 1 : 100 mit 0,9proz. NaCl-Lösung verdünnten Blutserumlösung (Mensch). Hierzu wurden 5 ccm gewöhnlicher verdünnter HCl, etwa 25proz., spez. Gew. 1,126, gegeben. Das Gemisch bleibt völlig klar und zeigt keinerlei Veränderung. Setzt man ihm eine wässerige Lösung (es wurde 10proz. Lösung angewandt) von Natr. sulfosalicylic. zu, so entsteht eine Trübung, die mit bloßem Auge betrachtet, bei weiterem Zusatz von Sulfosalicylsäure bis etwa zu einer zugefügten Menge von 10 ccm an Stärke zunimmt.

Diese Trübung ist vollkommen homogen und läßt auch bei stärkster Beleuchtung keinerlei Inhomogenität erkennen. Sie ist völlig frei von Flocken und in diesem Zustande über 1 Stunde lang haltbar. Nach dieser Zeit beginnt allmählich eine feine Flockung, die aber erst nach mehreren Stunden eine Größenordnung erreicht, die eine Abfiltration durch engporige Filter gestattet.

Die Reaktion schien daher für unseren Zweck hervorragend geeignet und diente uns zur Grundlage einer systematischen Durcharbeitung. Diese bestätigte ihre Eignung und ergab die einzelnen Bedingungen, die die exakte nephelometrische Bestimmung kleinster Eiweißmengen ermöglichen.

C. Untersuchungen der neuen Trübungsreaktion.

I. Einfluß der Zeit auf die Trübung.

Zuerst war es notwendig festzustellen, wie lange die Trübung haltbar bleibt, ohne ihre Struktur zu ändern.

Zu diesem Zweck wurden Eiweißtrübungen aus 5 ccm Serumverdünnung 1:100, 5 ccm HCl (25proz.) und 10 ccm 10proz. Na-Sulfosalicylsäurelösung hergestellt und gegen eine als konstant anzusehende Trübung nephelometrisch über längere Zeit hinaus verglichen. Da wir zur Zeit dieser Untersuchungen den in einer früheren Arbeit beschriebenen Trübungsstandard noch nicht besaßen, wurde als haltbare Vergleichslösung eine entsprechend verdünnte Stärkelösung gewählt. Ihr Farbton entspricht nur angenähert dem der Eiweißtrübung, ermöglicht aber doch noch einen Helligkeitsvergleich. Die Stärkelösung wurde auf die eine Seite des Nephelometers auf Skalenteil 40 gestellt und die Eiweißlösung auf der anderen Nephelometerseite auf gleiche Helligkeit eingestellt. Diese Einstellung wurde im Laufe einer Stunde alle 10 Minuten lang wiederholt und das Resultat durch Wiederholung in drei Parallelversuchen gesichert.

Tabelle I.

I.			II.			III.		
Zeit	Stellung d. Vergleichsstärkelösung	Eiweißlösung	Zeit	Stellung d. Vergleichsstärkelösung	Eiweißlösung	Zeit	Stellung d. Vergleichsstärkelösung	Eiweißlösung
9h 40′	40	24,0	11h 30′	40	26,0	12h 00′	40	11,7
9 45	40	24,0	11 40	40	26,0	12 10	40	11,7
9 50	40	23,8	11 50	40	26,0	12 20	40	11,7
9 55	40	24,0	11 60	40	26,0	12 30	40	11,7
10 00	40	24,0	12 00	40	26,0	12 40	40	11,7
10 10	40	24,1	12 10	40	26,0	12 50	40	11,3
10 20	40	24,0	12 20	40	26,0	1 00	40	beginnt
10 30	40	24,0	12 30	40	26,0	1 10	40	zu
10 40	40	24,0	12 50	40	26,0	1 20	40	flocken

Wie der Versuch zeigt, sind die Eiweißtrübungen rund 1 Stunde lang ohne irgendwelche Änderung ihrer Helligkeit haltbar. Sie erreichen ihr Trübungsmaximum in wenigen Augenblicken nach Zusatz der Sulfosalicylsäure, wobei zu beachten ist, daß bei verdünnteren Eiweißlösungen die Reifezeit ein wenig länger dauert als bei konzentrierteren. Für alle in Frage kommenden Konzentrationen ist die Vorschrift gültig, die Trübungen nach Zusatz der Sulfosalicylsäure 5 Minuten lang stehenzulassen und dann anschließend zu nephelometrieren. Die Trübungen bleiben 1 Stunde lang unverändert, doch ist es ratsam, die Nephelometrie nicht unnötig hinauszuzögern, da mitunter einmal, wenn auch nur als seltene Ausnahme, eine Trübung etwas früher zu flocken beginnen kann. Stets überzeuge man sich bei lange dauernden Reihenversuchen, ob die verglichenen Lösungen völlig homogen erscheinen. Eine beginnende Flockung ist bei einiger Übung schon mit bloßem Auge bei Betrachtung der stark beleuchteten Flüssigkeitssäule leicht erkennbar.

II. Einfluß der Reagenzmenge.

Um festzustellen, welche Mengen Sulfosalicylsäure notwendig sind, um eine maximale Trübung zu erzielen, wurden 5 ccm Serumverdünnung 1:100 mit steigenden Mengen 10proz. Sulfosalicyllösung in Form einer geometrischen Reihe versetzt, mit aqua dest. auf das gleiche Volumen, 20 ccm, gebracht und gegeneinander nephelometrisch verglichen.

Tabelle II.

Einfluß der Reagenzmenge.

5 ccm Serumlösung (1:100 verdünnt) + 5 ccm HCl + Na-Sulfosalicylsäurelösung (10proz. Lösung 1 bis 10 ccm) + aqua dest. ad 20 ccm.

Nr.	1	2	3	4	5	6
Sulfosalicylsäurel., ccm	1,0	1,6	2,5	4,0	6,3	10
Nephelometerstellung .	40	40	40	40	40	40
Gemessen	1 = 40	1 = 28,0	1 = 16,4	1 = 10,8	1 = 7,1	1 = 3,9

Durchschnitt aus fünf Ablesungen.

Da nach obiger Tabelle mit steigendem Sulfosalicylsäurezusatz auch die Trübung ständig zunimmt, wurde die Reihe weiter fortgesetzt. Als Endvolumen ergab sich nunmehr ein Volumen von 25 ccm, weshalb 6 ccm HCl zur Anwendung kamen.

Tabelle III.

Einfluß der Reagenzmenge.

5 ccm Serumlösung (verdünnt 1:100) + 6 ccm HCl + Na-Sulfosalicylsäurelösung (12,5proz.) + aqua dest. ad 25 ccm.

Nr.	1	2	3	4
Sulfosalicylsäurelösung, ccm . .	7,0	9,1	11,9	14,0
Nephelometerstellung	40	40	40	40
Gemessen	4 = 24	4 = 32,3	4 = 40	4 = 40

Durchschnitt aus fünf Ablesungen.

Nach Tabelle III scheint ein Trübungsmaximum bei Zusatz von rund 12 ccm 10proz. Sulfosalicylsäurelösung erreicht.

Den Einfluß weiteren Sulfosalicylsäurezusatzes prüft folgender Versuch, in dem eine Reihe mit Zusatz von 7 bis 14 ccm 20proz. Sulfosalicylsäure untersucht wird.

Tabelle IV.

Einfluß der Reagenzmenge.

5 ccm Serumlösung (1:100 verdünnt) + 6 ccm HCl + Na-Sulfosalicylsäurelösung (20proz., 7 bis 14 ccm) + aqua dest. ad 25 ccm.

Nr.	1	2	3	4
Sulfosalicylsäurelösung, ccm . .	7	9,1	11,9	9,4
Nephelometerstellung	40	40	40	40
Messung	4 = 40	4 = 40	4 = 39,6	4 = 40

Durchschnitt aus fünf Ablesungen.

Wie der Versuch lehrt, steigert eine weitere Vermehrung der Sulfosalicylsäuremenge die Trübung nicht mehr und beeinflußt sie auch nicht. Es ist also zur Erzielung einer maximalen Trübung ein bestimmter, und zwar recht beträchtlicher Überschuß an Sulfosalicylsäure notwendig, der aber bei weiterer Vermehrung die maximale Trübung nicht mehr ändert.

Als für alle nephelometrierbaren Eiweißkonzentrationen ausreichender Reagenzüberschuß ergab sich die Anwendung von 8 ccm 20proz. Na-Sulfosalicylsäurelösung bei einem Gesamtvolumen der untersuchten Lösung von 20 ccm. Diese Reagenzkonzentration wurde als Regel den weiteren Versuchen zugrunde gelegt.

III. Prüfung auf Reproduzierbarkeit.

Nunmehr wurde festzustellen versucht, ob die unter den angegebenen Bedingungen hergestellte Eiweißtrübung stets in gleicher Stärke beliebig reproduzierbar ist; diese Eigenschaft bildet die Grundbedingung für die nephelometrische Eignung der Reaktion. Zu diesem Zweck wurden sechs Parallelversuche mit 5 ccm einer Serumverdünnung 1:100 und fünf Parallelversuche mit 5 ccm einer Serumverdünnung 1:200 angestellt.

Tabelle V.

5 ccm Serumlösung (verdünnt 1:100) + 5 ccm HCl + 10 ccm 20proz. Na-Sulfosalicylsäurelösung.

Nr.	1	2	3	4	5	6
Nephelometerablesungen	40,0	40,0	39,9	40,0	39,9	40,0
	—	40,2	39,8	40,0	40,0	40,0
	—	40,0	39,9	40,0	40,0	40,0
	—	40,0	40,0	40,0	39,8	40,1
	—	39,9	39,1	40,0	40,0	40,0
Durchschnitt	40,0	40,0	39,9	40,0	39,9	40,0
Verglichen mit	1 = 40	1 = 40	1 = 40	1 = 40	1 = 40	1 = 40
Abweichung, Proz.	—	0,0	0,25	0,0	0,25	0,0

Tabelle VI.

Serumlösung (1:200 verdünnt) + 10 ccm 20proz. Na-Sulfosalicylsäurelösung + 5 ccm HCl.

Nr.	1	2	3	4	5
Nephelometerablesung	40,0	40,0	38,9	40,0	40,0
	—	40,0	38,8	40,2	40,0
	—	39,8	39,0	40,1	40,0
	—	40,0	38,9	40,2	40,0
	—	40,0	38,9	40,0	39,8
Durchschnitt	40,0	40,0	38,9	40,1	40,0
Verglichen mit	1 = 40	1 = 40	1 = 40	1 = 40	1 = 40
Abweichung, Proz. . . .	0,0	0,0	2,75	0,25	0,0

Wie aus diesen Versuchen hervorgeht, waren die Eiweißtrübungen mit einer minimalen Abweichung bis zu 0,25 Proz. (mit einer einzigen Ausnahme von 2,75 Proz.) genau reproduzierbar. Dieses Ergebnis ist

durch die vielen hundert Versuche im Laufe dieser Arbeit immer wieder bestätigt worden. Sie haben stets ergeben, daß die Eiweißtrübungen zu den best geeigneten Trübungen für nephelometrische Messungen gehören.

IV. Einfluß der Azidität.

Die Bedingungen, unter denen die Trübung entsteht, wurden durch systematische Variation studiert. Zunächst wurde festgestellt, welchen Einfluß die Variation der Azidität des Fällungsmediums auf die Trübung ausübt. Zu diesem Zweck wurden 5 ccm Serumverdünnung 1:200 mit 5 ccm 25prom. HCl und 8 ccm Na-Sulfosalicylsäurelösung versetzt und in einem Reihenversuch mit 0 bis 6 ccm n/1 HCl versetzt. Das Volumen wurde durch aqua dest. stets auf 25 ccm gebracht. Die Lösungen wurden nephelometrisch gegen eine Lösung gleichen Eiweißgehalts ohne Zusatz von n/1 HCl nephelometrisch verglichen.

Tabelle VII.

5 ccm Serumlösung (1:200) + 5 ccm HCl (25proz.) + 8 ccm Na-Sulfosalicylsäurelösung + 0 bis 6 ccm n/1 HCl + aqua dest. ad 25 ccm.

Nr.	1	2	3	4	5	6	7
Zusatz von HCl, ccm .	0	1	2	3	4	5	6
Nephelometerablesung	40,0	40,0	40,0	41,2	30,0	30,8	30,0
	—	39,8	40,2	40,8	30,0	30,5	30,5
	—	39,8	40,3	41,0	29,8	30,2	30,2
	—	40,0	40,0	40,9	29,9	30,0	30,0
	—	40,1	40,0	41.0	30,0	30,0	30,1
Durchschnitt	40,0	39,9	40,1	41,0	29,9	30,3	30,2
Verglichen mit	1 = 40	1 = 40	1 = 40	1 = 40	1 = 30	1 = 30	1 = 30
Abweichung, Proz. . . .	—	0,25	0,25	2,5	0,3	0,9	0,6

Da ein Zusatz bis zu 6 ccm n/1 HCl keine Änderung des Trübungsgrades verursachte, wurde eine zweite Reihe angesetzt, in der zu den 5 ccm 25proz. HCl 0 bis 3 ccm der gleichen Säure zugesetzt wurden.

Tabelle VIII.

5 ccm Serumlösung (1:200) + 5 ccm 25proz. HCl + 8 ccm Na-Sulfosalicylsäurelösung (20proz.) + 0 bis 3 ccm Zusatz aus 25proz. HCl + aqua dest. ad 25 ccm.

Nr.	1	2	3	4
HCl-Zusatz, ccm . . .	0	1	2	3
Nephelometerablesung	30,0	31,8	29,2	23,1
	—	31,9	29,3	23,0
	—	31,7	29,0	23,3
	—	31,9	29,1	23,0
	—	32,0	29,0	23,1
Durchschnitt	—	31,9	29,1	23,1
Verglichen mit	1 = 30	1 = 30	1 = 20	1 = 10
Abweichung, Proz. . .	—	2,7	45,5	13,1

Ein Zusatz von 1 ccm, d. h. des fünften Teiles der schon vorhandenen Säure bedingte eine kleine Abweichung von 2,7 Proz. im Sinne einer Aufhellung der Trübung, die beim weiteren Säurezusatz stark zunimmt.

Hieraus folgt, daß eine Säurevermehrung bis zu etwa 20 Proz. keinen Einfluß auf die Trübungsstärke ausübt.

V. Einfluß dritter Substanzen auf die Trübung.

Zur Prüfung des Einflusses fremder Substanzen auf die Trübung wurden Salze wie Ammoniumsulfat, Magnesiumsulfat und Ringerlösung zu den Eiweißlösungen zugesetzt. Den Einfluß solcher Substanzen, wie sie aus Gründen haltbarer Aufbewahrung Sera zugesetzt zu werden pflegen, prüft ein Versuch mit Zusatz von Thymol.

Schließlich wurden auch Eiweißabbauprodukte, die durch peptische Verdauung aus Serumlösungen hergestellt wurden, daraufhin geprüft, ob sie die Trübung zu beeinflussen vermögen, da solche Produkte bei der Einwirkung von Fermenten auf Eiweißlösungen entstehen und es beabsichtigt war, die Nephelometrie gerade für die Zwecke der Fermentforschung der Untersuchung dienstbar zu machen.

1. Einfluß von Ammoniumsulfat.

Den Einfluß von Ammoniumsulfat prüft ein Reihenversuch mit Zusatz von 0 bis 5 ccm gesättigter Ammoniumsulfatlösung zu 5 ccm Serumlösung 1:200. Das Gesamtvolumen betrug 25 ccm. Der Salzzusatz erfolgte nach Zugabe der Säure.

Tabelle IX.

5 ccm Serumlösung (1:200) + 6 ccm HCl + 8 ccm Na-Sulfosalicylsäurelösung + 0 bis 5 ccm gesättigter $(NH_4)_2SO_4$-Lösung + aqua dest. ad 25 ccm.

Nr.	1	2	3	4	5	6
$(NH_4)_2SO_4$-Lösung, ccm ges.	0	1	2	3	4	5
Nephelometerablesung	40,0	39,5	40,5	41,0	42,5	42,0
	—	39,5	40,5	40,7	42,2	42,0
	—	40,0	40,2	40,6	42,3	42,2
	—	39,6	40,0	40,4	42,2	42,0
	—	39,6	40,2	40,4	42,4	42,0
Durchschnitt	—	39,6	40,3	40,6	42,3	42,0
Abweichung, Proz.	—	1	0,75	1,25	5,8	5,0

Der Versuch lehrt, daß eine Menge bis zu etwa 3 ccm gesättigter Ammoniumsulfatlösung in 25 ccm Gesamtvolumen keinen Einfluß auf die Trübung hat.

2. Einfluß von Magnesiumsulfat.

Den Einfluß von Magnesiumsulfat prüft ein Reihenversuch mit Zusatz von 0 bis 6 ccm gesättigter $MgSO_4$-Lösung zu einer Eiweißlösung 1:200. Der Salzzusatz erfolgte nach Zugabe der HCl, das Gesamtvolumen betrug 25 ccm.

Tabelle X.

5 ccm Serumlösung (1:200) + 5 ccm HCl (25proz.) + 8 ccm Na-Sulfosalicylsäurelösung (20proz.) + konzentrierte $MgSO_4$-Lösung 0 bis 6 ccm.

Nr.	1	2	3	4	5	6	7
Konz. $MgSO_4$-Lösg., ccm	0	1	2	3	4	5	6
Nephelometerablesung	40,0	40,0	40,0	40,0	40,2	31,7	33,9
	—	40,1	40,7	40,0	40,0	31,0	33,9
	—	40,0	40,5	40,3	40,0	31,4	33,8
	—	40,0	40,3	40,2	40,2	31,4	33,7
	—	39,9	40,4	40,0	40,1	31.5	33,8
Ablesung		40,0	40,4	40,1	40,1	31,4	33,8
Verglichen mit	1 = 40	1 = 40	1 = 40	1 = 40	1 = 40	1 = 30	1 = 30
Abweichung, Proz. . . .		0,0	0,8	0,25	0,25	4,2	11,4

Der Versuch zeigt, daß Mengen bis zu 5 ccm gesättigter $MgSO_4$-Lösung bei einem Endvolumen von 25 ccm keinen Einfluß auf die Trübung ausüben.

3. Einfluß von Ringerlösung.

Ringerlösung wurde in gleicher Versuchsanordnung wie oben in Mengen von 0 bis 6 ccm zugesetzt.

Tabelle XI.

5 ccm Serumlösung (1:200) + 6 ccm HCl + 8 ccm Na-Sulfosalicylsäurelösung + 0 bis 6 ccm Ringerlösung + aqua dest. ad 25 ccm.

Nr.	1	2	3	4	5	6	7
Ringerlösung, ccm . . .	0	1	2	3	4	5	6
Nephelometerablesung	40,0	40,0	40,2	40,1	40,0	40,0	40,0
	—	40,0	40,3	40,3	40,0	40,0	40,0
	—	40,4	40,2	40,0	40,0	40,0	40,2
	—	40,4	40,0	40,0	39,8	40,2	40,0
	—	40,4	40,1	40,0	39,9	40,0	39,8
Durchschnitt	40,0	40,2	40,2	40,1	39,9	40,0	40,0
Verglichen mit	1 = 40	1 = 40	1 = 40	1 = 40	1 = 40	1 = 40	1 = 40
Abweichung, Proz. . . .		0,5	0,5	0,25	0,25	0,0	0,0

4. Einfluß von Thymol.

Zur Feststellung des Einflusses von Thymol wurden zu drei Versuchen mit 5 ccm Eiweißlösung 1:200 je ein kleiner Kristall Thymol gegeben. Diese — von den Thymolkristallen abfiltrierten — Lösungen wurden gegen eine gleiche ohne Thymolzusatz nephelometriert.

Der Versuch zeigt, daß der Zusatz von Thymol keinen Einfluß auf die Trübung ausübt. Sera, die zu nephelometrischen Versuchen verwandt werden sollen, können also durch Thymolzusatz haltbar aufgehoben werden, ohne ihre Eignung für die Methode zu verlieren.

Tabelle XII.

5 ccm Serumlösung (1:200) + 5 ccm HCl + 8 ccm Na-Sulfosalicylsäurelösung + aqua dest. ad 20 ccm + 1 Kristall Thymol.

Nr.	1	2	3	4
Thymol	—	—	+	+
Nephelometerablesung	40,0	40,0	39,9	40,2
	—	40,0	39,8	40,0
	—	40,1	40,0	40,4
	—	40,0	39,8	40,3
	—	40,0	40,0	40,0
Durchschnitt	—	40,0	39,9	40,2
Vergleichen mit	1 = 40	1 = 40	1 = 40	1 = 40
Abweichung, Proz. . .	—	0,0	0,25	0,5

5. Einfluß von Eiweißabbauprodukten.

Um den Einfluß von Eiweißabbauprodukten zu prüfen, wurde zur Gewinnung derselben eine Serumeiweißlösung 1:100 durch eine Pepsinlösung bei etwa 40°C im Wasserbade ¾ Stunden lang bei einer Azidität von n/10 HCl verdaut. Die Menge Eiweiß bzw. der Gehalt an Abbauprodukten in dieser Lösung wurde, unter Vernachlässigung der noch unbekannten Wirkung der Abbauprodukte, durch nephelometrischen Vergleich der Eiweißmenge der der Verdauung unterworfen gewesenen Lösung gegen eine Eiweißlösung 1:200 bestimmt.

Tabelle XIII.

Lösung 1 und 2 Eiweißlösung 1:200, Lösung 3 und 4 Eiweißlösung 1:100 ¾ Stunden verdaut.

Nr.	1	2	3	4
Nephelometerablesung	40,0	40,0	38,1	38,2
	—	39,8	38,4	38,0
	—	39,9	38,2	38,1
	—	40,0	38,1	38,2
	—	40,0	38,0	38,2
Durchschnitt	—	39,9	38,2	38,1
Verglichen mit	1 = 40	1 = 40	1 = 40	1 = 40

Wie die Tabelle zeigt, ergab die der Verdauung unterworfene Lösung fast den gleichen Eiweißgehalt wie die Vergleichslösung 1:200. Da sie ursprünglich den Gehalt 1 : 100 besaß, mußten etwa 50 Proz. Eiweiß verdaut sein. Die Lösung wurde nahezu mit n/10 NaOH neutralisiert und durch Zusatz von Sulfosalicylsäure enteiweißt. Das Eiweiß scheidet sich bei der geringen Azidität der Lösung gut flockig ab und kann leicht abfiltriert werden. Von dem klaren Filtrat, das die bei neutraler Reaktion durch Sulfosalicylsäure nicht fällbaren Eiweißabbauprodukte enthielt, wurden 0 bis 16 ccm in einem Reihenversuch einer Lösung von je 4 ccm Serum 1:200 zugesetzt. Das Endvolumen betrug 45 ccm.

Tabelle XIV.

4 ccm Serumlösung (1:200) + 10 ccm HCl + 10 ccm Na-Sulfosalicylsäurelösung + 0 bis 16 ccm der verdauten Eiweißlösung + aqua dest. ad 45 ccm.

Nr.	1	2	3	4	5
Eiweißlösung, ccm . . .	0	2	4	8	16
Nephelometerablesung	40,0 — — — —	40,3 40,0 40,0 39,8 39,9	40,2 40,0 40,0 40,0 40,1	40,0 39,8 39,7 39,8 39,5	39,0 39,2 39,9 39,5 39,9
Durchschnitt	40,0	40,0	40,1	39,7	39,5
Verglichen mit	1 = 40	1 = 40	1 = 40	1 = 40	1 = 40
Abweichung, Proz. . . .	—	0,0	0,25	0,75	1,25

Wie der Versuch zeigt, haben selbst Mengen von 16 ccm der die Eiweißabbauprodukte enthaltenden Lösung keinen Einfluß auf die Trübung.

Da die 16 ccm einer Eiweißlösung entsprechen, deren Verdünnung 1 : 100 war und die zu 50 Proz. verdaut wurde, so entspricht ihr Zusatz zu 4 ccm einer Serumverdünnung 1 : 200 einem System, in dem 80 Proz. der ursprünglich vorhandenen Eiweißmenge verdaut wurden, d. h. bei einer Eiweißspaltung bis zu 80 Proz. vermögen die Eiweißabbauprodukte noch nicht die nephelometrische Bestimmung der zurückbleibenden Eiweißmenge zu beeinflussen.

Da die Eiweißabbauprodukte aus einer Lösung gewonnen wurden, die mittels Sulfosalicylsäure bei nahezu neutraler Reaktion enteiweißt wurde, lag die Möglichkeit vor, daß sie nicht identisch waren mit den Produkten, die bei Enteiweißung in stark saurer Lösung mit Sulfosalicylsäure — also bei den Bedingungen der nephelometrischen Bestimmung — in Lösung bleiben. Denn wie Versuche, die in einer folgenden Arbeit dargelegt werden, zeigten, bleiben bei saurer Reaktion Substanzen in Lösung, die bei neutraler mit Sulfosalicylsäure gefällt werden, und es wäre denkbar, daß gerade diese Substanzen imstande seien, einen Einfluß auf die Eiweißtrübung auszuüben.

Um auch diese letzte Fehlerquelle auszuschließen, wurden Eiweißabbauprodukte aus einer Eiweißlösung (1:100) gewonnen, die nach teilweiser Verdauung in der Art enteiweißt wurde, als ob sie nephelometriert würde, d. h. sie wurde im Verhältnis: „5 ccm Serumlösung, 5 ccm HCl, 8 ccm Sulfosalicylsäurelösung“ mit diesen Reagenzien versetzt. Der entstehenden Trübung wurde mehrere Stunden Zeit gelassen zu sedimentieren, worauf die Eiweißflocken durch mehrmalige Filtration durch zwei gehärtete Filter entfernt werden konnten. Von dem klaren Filtrat wurden 0 bis 8 ccm zu 1 ccm einer Serumverdünnung 1:40 (= 5 ccm 1:200) zugesetzt, wobei die in ihnen enthaltene Säuremenge derart berücksichtigt wurde, daß in der schließlich gemessenen Lösung stets 5 ccm 25proz. HCl waren.

Tabelle XV. Derselbe Versuch, enteiweißt in saurer Lösung.
1 ccm Serumverdünnung (1:40) + 6 ccm HCl + 8 ccm Na-Sulfosalicylsäurelösung + 0 bis 8 ccm verdaute Eiweißlösung + aqua dest. ad 25 ccm.

Nr.	1	2	3	4	5
Eiweißlösung, ccm . . .	0	1	2	4	8
Nephelometerablesung	40,0	40,5	40,4	39,0	42,1
	—	40,4	40,5	39,9	42,1
	—	40,6	40,3	39,9	42,0
	—	40,5	40,4	39,7	42,4
	—	40,5	40,4	39,9	42,8
Durchschnitt	—	40,5	40,4	39,9	42,3
Abweichung, Proz.	—	1,25	1,0	0,75	4,2

Die Versuche lehren, daß Mengen bis zu 8 ccm zugesetzter Lösung, die also einer Verdauung von rund 65 Proz. einer ursprünglichen Eiweißlösung entsprechen, keinen Einfluß auf die Trübung ausüben.

6. Über die Beziehung zwischen Trübung und Konzentration.

Um festzustellen, ob auch bei der Eiweißsalicylsäuretrübung das in früheren Arbeiten gefundene Gesetz befolgt wird, daß bei gleicher Teilchengröße der Trübungsgrad zweier Lösungen sich proportional ihrer Konzentration und sich diese somit umgekehrt proportional der Höhe der Tyndallkegel der Lösungen verhält, wurden in einem Vorversuche vier Lösungen von den Eiweißkonzentrationen 1 : 100, 1 : 200, 1 : 300, 1 : 400 miteinander verglichen.

Tabelle XVI.

Nr.	1	2	3	4
Konzentration der Serumlösung .	1/100	1/200	1/300	1/400
Nephelometerablesung	40,0	20,0	30,0	40,5
	—	19,9	30,3	40,8
	—	19,8	30,2	40,6
	—	20,0	30,1	40,7
	—	20,0	30,2	40,8
Durchschnitt	—	19,9	30,2	40,7
Verglichen mit	—	1 = 10	1 = 10	1 = 10
Abweichung, Proz.	—	0,5	0,6	1,8

Dieser Versuch bestätigte mit guter Genauigkeit das Gesetz der Proportionalität.

Um dasselbe aber bei den verschiedenen Eiweißkonzentrationen exakt festzulegen, wurden Reihenversuche derart angestellt, daß Reihen mit sieben Punkten, deren Anfangsglied sich zum Endglied wie 1:2 verhielt, angelegt wurden. Die einzelnen Punkte wurden gegen das Anfangsglied der Reihe, das als Standard auf den Skalenteil 40 der Nephelometerskala gebracht wurde, gemessen. Es wurde über das Messungsverhältnis 1:2 nicht hinausgegangen, da dasselbe für alle praktischen Zwecke vollkommen ausreicht und die Beschränkung auf dasselbe die Messungsgenauigkeit vergrößerte.

Es wurden Reihen von 2,5 bis 5 ccm von Lösungen 1:50, 1:100, 1:200, 1:400, 1:500, unter welchen Zahlen das Verdünnungsverhältnis menschlichen Blutserums zu verstehen ist, angewandt. Das Endvolumen betrug 20 ccm.

Tabelle XVII. Serumlösung 1:50 (2,5 bis 5 ccm) + 5 ccm HCl + 8 ccm Na-Sulfosalicylsäurelösung + aqua dest. ad 20 ccm.

Nr.	1a	1b	2a	2b
Serumlösung, ccm . . .	5,0	5,0	2,5	2,5
Nephelometerablesung	40,0 — — — —	40,0 40,2 40,1 40,3 40,0	40,2 40,0 40,1 40,0 40,2	40,0 40,2 40,1 40,2 40,0
Durchschnitt	—	40,1	40,1	40,1
Verglichen mit	—	1 = 40	1 = 20	1 = 20
Abweichung, Proz. . .	—	0,25	0,25	0,25

Tabelle XVIII. Serumlösung (1:100 verdünnt) 2,5 bis 5,0 ccm + 5 ccm HCl + 8 ccm Na-Sulfosalicylsäurelösung + aqua dest. ad 20 ccm.

Nr.	1a	1b	2a	2b	3a	3b	4a	4b
Serumlösung, ccm	2,5	2,5	3,15	3,15	3,97	3,97	5,0	5,0
Nephelometerablesung . .	40,0 — — — —	40,0 40,0 40,0 40,0 40,0	31,6 32,1 32,1 31,7 31,9	31,6 32,0 31,7 31,8 32,0	25,6 25,6 25,5 25,3 25,4	25,3 25,2 25,5 25,6 25,4	20,0 19,9 19,9 20,0 20,0	20,2 20,1 20.2 20,0 19,9
Durchschnitt	—	40,0	31,9	31,8	25,5	25,4	20,0	20,1
			31,85		25,45		20,05	
Verglichen mit	1 = 40		1 = 40		1 = 40		1 = 40	
Theoretischer Wert	—		31,75		25,2		20,0	
Abweichung, Proz.	0,0		0,3		1,0		0,25	

Tabelle XIX. Serumlösung (1:200) 2,5 bis 5 ccm + 5 ccm HCl + 8 ccm Na-Sulfosalicylsäurelösung + aqua dest. ad 20 ccm.

Nr.	1a	1b	2a	2b	3a	3b	4a	4b
Serumlösung, ccm	2,5	2,5	3,15	3,15	3,97	3,97	5,0	5,0
Nephelometerablesung . .	40,0 — — — —	40,0 40,0 40,1 40,0 40,1	31,0 31,2 31,5 31,1 31,3	31,4 31,3 31,5 31,1 31,6	25,4 25,0 25,0 25,0 25,3	25,3 25,0 25,2 25,1 25,4	19,4 20,0 20,0 20,0 20,0	20,0 20,2 20,1 20,0 20,0
		40,0	31,2	31,4	25,1	25,2	19,9	20,1
Durchschnitt	40,0		31,3		25,15		20,0	
Verglichen mit	1 = 40		1 = 40		1 = 40		1 = 40	
Theoretischer Wert	40,0		31,75		25,2		20,0	
Abweichung, Proz.	0,0		1,3		0,2		0,0	

Tabelle XX.

Serumlösung 1:400 (2,5 bis 5 ccm) + 5 ccm HCl + 8 ccm Na-Sulfosalicylsäurelösung + aqua dest. ad 20 ccm.

Nr.	1a	1b	2a	2b	3a	3b	4a	4b
Serumlösung, ccm	2,5	2,5	3,2	3,2	3,97	3,97	5,0	5,0
Nephelometerablesung . .	40,0 40,0 40,0 40,1 40,1	40,0 40,0 40,1 40,2 40,0	31,5 31,7 31,8 31,6 31,5	31,1 31,0 31,9 31,2 31,0	25,2 25,3 25,4 25,2 25,3	25,2 25,1 25,0 25,2 25,3	20,0 20,0 20,1 20,0 20,0	20,0 20,0 20,0 20,0 20,0
Durchschnitt	40,1	40,1	31,6	31,2	25,3	25,2	20,0	20,0
			31,4		25,25			
Verglichen mit	4 = 20	4 = 20	4 = 20	4 = 20	4 = 20	4 = 20	4 = 20	4 = 20
Theoretischer Wert	40,0	40,0	31,25		25,2		20,0	
Abweichung, Proz.	0,25		0,5		0,2		0,0	

Tabelle XXI.

Serumlösung (1:500) 2,5 bis 5 ccm + 5 ccm HCl + 8 ccm Na-Sulfosalicylsäurelösung + aqua dest. ad 20 ccm.

Nr.	1a	1b	2a	2b	3a	3b	4a	4b
Serumlösung, ccm	2,5	2,5	3,15	3,15	3,97	3,97	5,0	5,0
Nephelometerablesung . .	Zu geringe Trübung, Skala nicht ausreichend.				25,2 25,4 25,5 25,3 25,5	25,1 25,0 25,0 25,4 25,0	20,0 20,0 20,0 20,1 20,0	20,0 20,0 20,0 20,0 20,0
Durchschnitt	—	—	—	—	25,4	25,1	20,0	20,0
					25,25		20,0	
Verglichen mit	4 = 20	4 = 20	4 = 20	4 = 20	4 = 20	4 = 20	4 = 20	4 = 20
Theoretischer Wert	40,0	40,0	31,75		25,2		20,0	
Abweichung, Proz.	—		—		0,2		0,0	

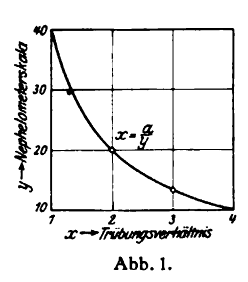


Abb. 1.

Diese Versuche lehren, daß innerhalb der untersuchten Grenzen absolut genaue Proportionalität zwischen Trübung und Konzentration besteht. Dieses bei der Bestimmung der Phosphorsäure und von Calcium gefundene Gesetz wird also auch bei der Eiweißnephelometrie bestätigt.

Die graphische Darstellung dieses Verhaltens gibt die nebenstehende Abbildung, die als Hyperbel die umgekehrte Proportionalität zwischen Tyndallkegelhöhe (Nephelometerablesung) und Trübungsverhältnis veranschaulicht.

7. Das Bereich der nephelometrischen Eiweißbestimmung.

Was die Konzentrationen der nephelometrisch bestimmbaren Eiweißlösungen betrifft, so ist zu sagen, daß die obere Grenze insofern nicht gezogen zu werden braucht, da jedwede Eiweißkonzentration beliebig durch Verdünnen verringert werden kann. Der oberste nephelometrisch meßbare Wert entspräche etwa 5 ccm einer Serumverdünnung 1 : 50 bei einem Endvolumen von 20 ccm. Diese Lösung ist schon sehr stark trübe und neigt zur Flockung.

Die untere Grenze liegt etwa bei der Anwendung von 4 ccm einer Verdünnung menschlichen Blutserums im Verhältnis 1 : 500 bei einem Endvolumen von 20 ccm. Da menschliches Blutserum einen Gehalt von etwa 7 Proz. Eiweiß aufweist, so entspricht die obere Grenze der Bestimmbarkeit einer Menge von 0,6 mg Eiweiß, gleich einer Menge von etwa 0,1 mg N in 20 ccm Volumen. Oder anders ausgedrückt, die Konzentration der unteren Grenze an Eiweiß beträgt etwa 0,03 Prom.

Bei Anwendung der Mikronephelometrie, bei der Gläschen von 2,5 und 1,6 ccm Volumen anwendbar, läßt sich die absolut bestimmbare Eiweißmenge noch etwa um das Zehnfache erniedrigen, so daß Eiweißmengen bis zu der Größenordnung von 0,06 mg, entsprechend 0,01 mg N, noch bestimmbar wären.

8. Fehlerberechnung.

Zur Berechnung des bei der nephelometrischen Eiweißbestimmung entstehenden Fehlers wurden von den Versuchen der Tabellen XVII bis XXI der durchschnittliche prozentuale Fehler der einzelnen Versuche und hieraus der gesamte durchschnittliche Fehler aller Versuche berechnet.

Des weiteren wurde aber auch nach der Formel $x_q = 0{,}673 \sqrt{\frac{\Sigma\,(x^2)}{n}}$ der wahrscheinliche Fehler der einzelnen Versuche und aus dem Durchschnitt der wahrscheinlichen Fehler der wahrscheinliche Fehler der Methode errechnet.

Tabelle XXII.
Fehlerberechnung.

	Durchschnittlicher Fehler	Wahrscheinl. Fehler $x_q = 0{,}673 \sqrt{\frac{\Sigma\,(x^2)}{n}}$
Tabelle XVII .	0,25 Proz.	0,17 Proz.
„ XVIII .	0,39 „	0,12 „
„ XIX .	0,38 „	0,14 „
„ XX .	0,23 „	0,2 „
„ XXI .	0,1 „	0,1 „
Durchschnitt .	0,27 Proz.	0,15 Proz.

Wie die Tabelle zeigt, beträgt *der durchschnittliche Fehler etwa 0,3 Proz., der wahrscheinliche Fehler etwa 0,2 Proz.* Diese Genauigkeit der Messung beweist die Eignung der Eiweißsulfosalicylsäuretrübung für die nephelometrische Messung. Die Fehlergröße variiert natürlich mit der Übung des Untersuchers im nephelometrischen Arbeiten, ist aber in kurzer Zeit auf die angegebene Größenordnung beschränkbar.

Zusammenfassung.

Es wird eine Methode zur nephelometrischen Bestimmung kleinster Eiweißmengen gegeben. Sie ermöglicht eine exakte Eiweißbestimmung in wenigen Minuten und gestattet lange Reihenversuche speziell im Hinblick auf das Studium fermentativer Eiweißspaltung. Als Nephelometer dient das Nephelometer von *Kleinmann* der Firma Schmidt & Haensch.

Es gelingt, eine völlig homogene und haltbare Eiweißtrübung durch starke Azidität des Fällungsmediums und großen Sulfosalicylsäureüberschuß zu erzielen. Die für alle Versuche geeigneten Reaktionsbedingungen sind: 5 ccm Eiweißlösung (Verdünnungen menschlichen Blutserums mit physiologischer NaCl-Lösung im Verhältnis 1 : 50 bis 1 : 500), 5 ccm 25proz. HCl, 8 ccm 20proz. wässeriger Lösung von Natrium sulfosalicylicum und Auffüllen mit aqua dest. ad 20 ccm.

Die Lösungen werden in angegebener Reihenfolge mittels Pipetten zueinander gegeben. Die entstehende völlig homogene Trübung erreicht nach etwa 3 Minuten ihr Maximum und ist dann etwa 1 Stunde völlig unverändert haltbar.

Die angegebene Menge Na-Sulfosalicylsäurelösung ist notwendig und für das ganze Messungsbereich ausreichend.

Die Trübung ist beliebig mit großer Genauigkeit reproduzierbar. Eine Vermehrung der Azidität des Fällungsmediums bis zu 20 Proz. ist ohne Einfluß auf die Trübung.

Sie verträgt ohne irgendwelche Änderung einen Zusatz bis zu 3 ccm gesättigter Ammoniumsulfatlösung, 5 ccm gesättigter Magnesiumsulfatlösung, 6 ccm Ringerlösung, und läßt sich mit Thymol sättigen, so daß die anzuwendenden Eiweißlösungen vor der Benutzung ohne Schaden mit Thymol versetzt aufbewahrt werden können. Eiweißabbauprodukte, die durch peptische Verdauung von Eiweiß gewonnen wurden, ändern bei einem Abbau bis zu 60 Proz. (bis zu dieser Grenze untersucht) einer Eiweißlösung den nephelometrischen Wert des unverdauten Eiweißes nicht.

Die Eiweißsulfosalicylsäuretrübung folgt exakt dem Gesetz der Proportionalität, d. h. die Trübung ist proportional der Konzentration und umgekehrt proportional der Höhe der Tyndallkegel.

Die Grenzen der nephelometrischen Eiweißbestimmung liegen bei den absoluten Eiweißmengen von 6,0 bis 0,6 mg Eiweiß, entsprechend 1,0 bis 0,1 mg N, in 20 ccm Volumen, d. h. die untere Grenze der Konzentration ist die einer 0,03 prom. Eiweißlösung. Die absolut bestimmbare Eiweißmenge läßt sich bei Anwendung der Mikronephelometrie um das Zehnfache herabsetzen, so daß noch Mengen von 0,06 mg Eiweiß, entsprechend 0,01 mg N, exakt meßbar sind. Der durchschnittliche Fehler der Methode beträgt 0,3 Proz., der wahrscheinliche Fehler 0,2 Proz.

Unserer Mitarbeiterin, Frl. *Grete Lönsson*, die uns bei Durchführung der Arbeit sehr wertvolle Hilfe leistete, sei an dieser Stelle nochmals unser bester Dank ausgesprochen.

Literatur.

1) *H. Kleinmann*, diese Zeitschr. **99**, 4—6. — 2) *P. Rona* u. *H. Kleinmann*, ebendaselbst **137**, H. 1/3. — 3) *Jacoby-Solms*, diese Zeitschr. **101**, 53, 1908; Zeitschr. f. klin. Med. **64**, 159, 1903; vgl. auch *R. Ege*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **127**, 125, 1923. — 4) *Fuld-Levison*, diese Zeitschr. **6**, 473, 1907. — 5) *Gross*, Berl. klin. Wochenschr. 1908, Nr. 13. — 6) *L. Michaelis* und *P. Rothstein*, diese Zeitschr. **105**, 60, 1920. — 7) *Henri Bénard* et *Albert Laborde*, C. r. hebdom. des séances de l'acad. des sciences **176**, Nr. 2, S. 98—101, 1923. — 8) *S. Rusznyák*, diese Zeitschr. **133**, H. 4—6.

Nephelometrische Untersuchungen über fermentative Eiweißspaltung.

Von

P. Rona und **H. Kleinmann.**

(Aus der chemischen Abteilung des pathologischen Instituts der Universität Charité Berlin.)

(Eingegangen am 21. Juni 1923.)

Mit 10 Abbildungen im Text.

I.

Nachdem in der vorangehenden Arbeit eine Methode ausgearbeitet worden ist, die gestattet, die Konzentration sehr verdünnter Eiweißlösungen — bis zu 0,5 Prom. — mit einer Genauigkeit von etwa 0,3 Proz. zu messen und deren Einfachheit es ermöglicht, Reihenuntersuchungen in kürzester Zeit vorzunehmen, lag es nahe, den Versuch zu machen, diese Methode in den Dienst der Fermentforschung zu stellen. Sie ermöglicht es, Eiweißlösungen von äußerst geringer Konzentration zur Untersuchung zu verwenden. Hierdurch gelingt es dann weiter, sehr starke Verdünnungen von Fermentlösungen anzuwenden, so daß relativ nur sehr geringe Mengen fremder Substanzen durch die Fermentlösung dem Versuchssystem beigemischt werden. Und schließlich gestattet die Feinheit der Methode, den Beginn einer Spaltung exakt zu verfolgen, der gerade zum Studium von Gesetzmäßigkeiten sowie bei vergleichenden Fermentuntersuchungen von besonderer Wichtigkeit und Bedeutung ist.

Das Prinzip der von uns angewandten Methode beruht darauf, optisch klare Eiweißlösungen durch Zusatz ebenfalls optisch klarer Fermentlösungen teilweise zu spalten und nach erfolgter Einwirkung den noch nicht gespaltenen Eiweißrest gemäß der Methode unserer Eiweißbestimmung in stark saurer Lösung durch Sulfosalicylsäure in Form einer homogenen Trübung abzuscheiden, deren Konzentration durch nephelometrischen Vergleich mit einer solchen bekannter Konzentration ermittelt wird. Durch diese Untersuchungsform ist es möglich gemacht, Eiweißspaltungen unter den variierendsten Bedingungen (Aziditätsänderung, Zusätze fremder Substanzen usw.) zu studieren, da die Bedingungen, die für die Bestimmung selbst not-

wendig sind (Säuregehalt, Konzentration usw.), erst nach erfolgter Fermentspaltung unmittelbar vor der Bestimmung selbst hergestellt zu werden brauchen. Somit ist die Untersuchungsform unabhängig von der Bestimmungsform. Die einzige Bedingung, die sich an unsere Methode knüpft, ist die optische Klarheit der zur Untersuchung bestimmten Medien.

Bei den mannigfaltigen Versuchen, den Gang der Eiweißspaltung vergleichend nephelometrisch und chemisch zu verfolgen — wobei eine Übereinstimmung nicht zu erwarten ist —, hatten wir keinen Erfolg. Hierzu wären gleiche Versuchsbedingungen notwendig gewesen, diese lassen sich aber nicht herstellen, da die Bedingungen, die für die Nephelometrie notwendig sind, die chemische N-Bestimmung unmöglich machen und umgekehrt.

II.

Die Methode, die wir den folgenden Versuchen zugrunde legten, sei zusammenfassend dargestellt. Denn so einfach die Methode auch an sich ist und so schnell sie erlernbar, so notwendig ist es auch, zur Erzielung guter Resultate alle einzelnen angeführten Punkte genauestens zu beachten.

Als Eiweißsubstrat dienen Verdünnungen von Tiersera mit physiologischer Kochsalzlösung. Wir verwendeten menschliches Serum, dessen endgültige Verdünnung bei der Spaltung meist 1:80 war, da bei einer Spaltung von etwa 50 Proz. eine Eiweißkonzentration von 1:160 gemessen wird und die Eiweißverdünnungen von 1:100 bis 1:200 am angenehmsten nephelometrierbar sind. Selbstverständlich lassen sich aber Serumverdünnungen in dem nephelometrisch meßbaren Bereich von 5 ccm Lösung 1:50 bis 1:500 untersuchen. Das Serum wurde sorgfältig zentrifugiert und zur bequemeren weiteren Abmessung in einer Verdünnung 1:25 aufgehoben.

Als Fermentlösungen dienen Auflösungen von Pepsinpräparaten in physiologischer Kochsalzlösung, die klar und farblos sein müssen, was bei den großen Verdünnungen stets erzielbar. Von eventuellen Rückständen müssen die Lösungen stets filtriert werden. Wir benutzten das käufliche weiße Pepsinpulver der Apotheke, von dem 2 ccm einer Verdünnung 1:500 bei den von uns verwandten Volumina eine Spaltung von etwa 50 Proz. in einer halben Stunde bewirkten. Von dem sehr viel stärker wirkenden „Pepsin *Grübler*“ können natürlich viel stärkere Verdünnungen genommen werden. Die notwendige Verdünnung ist bei jedem Pepsinpräparat durch einen Vorversuch erst einmal zu ermitteln. Die endgültige Verdünnung des von uns benutzten Pepsins war, da 2 ccm der Lösung 1:500 bei einem Endvolumen von 67 ccm angewandt wurden, etwa 1:17000. Alle anzuwendenden Lösungen wie NaCl-Lösung und speziell die Natronlauge (s. d.) müssen sorgfältig faserfrei filtriert werden. Als Beispiel sei die Untersuchung der Wirkung zweier Fermentkonzentrationen auf die gleiche Substratmenge gegeben. Die Ausführung eines Versuches gestaltet sich folgendermaßen:

20 ccm der Serumverdünnung 1:25 werden in ein 150 ccm fassendes Erlenmeyerkölbchen einpipettiert. Hierzu werden 7,5 ccm n/1 HCl gegeben, und schließlich wird das Volumen der Mischung mit physiologischer NaCl-

Lösung auf 75 ccm gebracht. In gleicher Form wird ein zweites Versuchskölbchen bereitet. Beide Erlenmeyerkolben werden nunmehr in ein Temperierbad gebracht, das nach der bei Fermentversuchen allgemein üblichen Art mit mechanischer Rührvorrichtung, Thermoregulator und Thermometer ausgerüstet ist. Das Temperierbad wurde vor dem Einsetzen der Kölbchen auf 40°C gebracht und der Thermoregulator auf diese Temperatur eingestellt. Außer den Versuchskölbchen kommen in das Temperierbad in Reagenzgläschen zwei Fermentverdünnungen von der Konzentration a und b, deren Wirkung in dem betreffenden Beispiel studiert werden soll. Während Substratlösung und Fermentlösung im Wasserbade vorwärmen, werden so viel Bechergläser hergerichtet, wie Messungspunkte festgelegt werden sollen. Da wir meist sieben Messungspunkte unseren Kurven zugrunde legten, so bedurften wir bei Arbeiten mit zwei parallelen Messungen für den gewählten Vergleich zweier Fermentkonzentrationen 28 Bechergläschen von etwa 75 ccm Volumen.

Diese Gläschen müssen aufs sorgfältigste gereinigt, mit destilliertem Wasser gespült werden und vollkommen trocken sein. Nach Benutzung mit Eiweißlösungen müssen sie stets mit Natronlauge zur Entfernung der letzten Eiweißspuren ausgespült werden. In die Bechergläschen werden je 4,7 ccm n/10 NaOH einpipettiert. Diese Natronlauge dient dazu, um 5 ccm der n/10 sauren Eiweißlösung, die zur Festlegung eines Messungspunktes im Verlauf der Spaltung dem Gemisch entnommen werden, nahezu zu neutralisieren. Die Neutralisation ist notwendig, um die Fermentwirkung plötzlich und vollständig zu unterbrechen. Eine genaue Neutralisation ist aber nicht angängig, da die Eiweißlösungen hierbei leicht trüben. Die bei dieser Versuchsanordnung vorhandene Azidität entspricht einer Azidität von 0,3 ccm n/10 HCl in einem Volumen von 9,7 ccm, also einer Lösung, die gleich einer n/0,003 HCl ist, wobei noch die geringe an das Eiweiß gebundene Menge HCl vernachlässigt wird. Bei dieser Azidität hört die peptische Wirkung des Ferments praktisch auf. Andererseits bleiben die Eiweißverdünnungen der angewandten Konzentration bei dieser Azidität klar und trüben auch nach einiger Zeit nicht nach. Es gelingt also durch Einfließenlassen von 5 ccm Eiweißlösung in 4,7 ccm n/10 NaOH die Fermentwirkung zu unterbrechen, ohne die optische Klarheit der Lösung oder ihre kolloide Struktur zu ändern.

Sind die Gläser vorbereitet und die Lösungen im Wasserbad temperiert, so werden mit einer in $^1/_{100}$ ccm geteilten Pipette aus beiden Erlenmeyerkölbchen zweimal je 5 ccm entnommen und je 4,85 ccm von diesen in je ein Becherglas einpipettiert. Die rückbleibenden 0,15 ccm werden verworfen. Daß 4,85 ccm und nicht 5 ccm bei der ersten Entnahme einpipettiert werden, findet seinen Grund darin, daß die zurückbleibenden 65 ccm Eiweißlösung nunmehr durch Zufügen von 2 ccm Fermentlösung auf 67 ccm verdünnt werden.

Diese 2 ccm Fermentlösung werden je einem Erlenmeyerkolben mit sauberer Pipette zugefügt. Der Kolben wird hierbei geschüttelt und die Zeit des Zufließenlassens durch Anstellen einer Stoppuhr markiert. Jetzt werden im Verlauf bestimmter Zeitabschnitte — wir arbeiten in Abständen von 5 Minuten — mittels tadelloser Vollpipette (für jedes Kölbchen ist wegen der verschiedenen Fermentkonzentrationen eine besondere Pipette zu benutzen) 5 ccm der Eiweißlösung den Kölbchen entnommen und in die Bechergläser zu der Natronlauge fließen gelassen. Man kann die Zeitabschnitte der Entnahme beliebig wählen, wenn man nur den Augenblick

der Unterbrechung der Fermentwirkung, also den des Einfließenlassens in die Lauge, durch die Ablesung an der Stoppuhr markiert. Wir fanden es aber praktischer, stets genau in den gleichen Abständen von 5 Minuten zu entnehmen und wählten die Zeit derart, daß dem zweiten Kölbchen immer zwei Minuten später entnommen wurde als dem ersten. Die Entnahmen folgten sich also aus den beiden Kölbchen in 2 und 3 Minuten. Diese Zeit genügt hinlänglich zur vollkommen ruhigen Erledigung aller Handgriffe. Vor jeder Entnahme wurde die Ferment-Eiweißlösung mittels der Pipette gut durchgerührt. Die Pipette wurde, um ein gleichmäßiges Arbeiten zu gewährleisten, stets ausgeblasen.

Für unsere anfänglichen Versuche entnahmen wir bei jedem Bestimmungspunkte bei jeder Entnahme zweimal hintereinander je 5 ccm, um für die nephelometrische Bestimmung Parallelversuche anstellen zu können.

Nach der siebenten Entnahme, also nach 30 Minuten Spaltungszeit, pflegten wir den Versuch zu beendigen. Der im Erlenmeyerkolben zurückbleibende Flüssigkeitsrest von etwa 7 ccm dient zur Bestimmung der Wasserstoffionenkonzentration.

Die Eiweißlösungen in den Bechergläsern können ruhig stehenbleiben, oder, was doch empfehlenswert, gleich nephelometriert werden. Zu diesem Zwecke werden sie mit je 5 ccm 25proz. HCl und 8 ccm 20proz. Na-Sulfosalicylsäurelösung versetzt, leicht umgeschüttelt, 3 Minuten stehengelassen und am Nephelometer gemessen.

Für alle Messungen diente uns das Nephelometer nach *Kleinmann* der Firma Schmidt & Haensch.

Die Messung erfolgte gegen die erste Entnahme der noch ungespaltenen Eiweißlösung, deren Gehalt zu 100 Proz. angesehen wurde, als Vergleich.

Alle Einzelheiten über die Technik der Nephelometrie sind in früheren Arbeiten gegeben worden. Alle dort gegebenen Vorschriften sind genauestens zu beachten. Auch sei auf die vorangehende Arbeit über nephelometrische Eiweißbestimmung verwiesen.

Mit Hilfe dieser Methode sind alle folgenden Versuche angestellt worden.

III. Versuche über peptische Verdauung mittels nephelometrischer Methode.

1. Variation der Fermentkonzentrationen bei gleicher Substratkonzentration.

Für die folgenden Versuche wurden Substratmengen von 25 ccm einer Serumverdünnung 1:25 angewandt. Für den ersten Versuch dienten als Fermentlösung 2 ccm einer Pepsinlösung 1:500. Die Azidität war gleich der einer n/10 HCl, das Endvolumen 75 ccm.

Bei den folgenden Versuchen wurden die Fermentkonzentrationen wie bei den Versuchen angegeben variiert [1]). Die zugegebenen Mengen Fermentlösung betrugen stets 2 ccm, doch entsprach ihre Konzentration bei dem Konzentrationsverhältnis 3:5 einer Verdünnung 1:300 und 1:500, bei dem Verhältnis 1:2 einer Verdünnung 1:250 und 1:500, bei dem Verhältnis 1:3 einer Verdünnung 1:300 und 1:900, bei dem Verhältnis 1:4 einem Verhältnis 1:250 und 1:1000.

---

[1]) Es wurden Fermentkonzentrationen von dem Verhältnis 3:5, 1:2, 1:3 und 1:4 verglichen.

Es seien die Versuche und die aus ihnen folgende graphische Darstellung wie folgt gegeben.

Tabelle I (zu Abb. 1).

Nr.	I		II		III		IV		V		VI	
Minuten Spaltungszeit	0		5		10		15		20		25	
			a	a_1	a	a_1	a	a_1	a	a_1	a	a_1
	$p_H = 0{,}92$											
Nephelometerablesung	20,0	20,0	21,0	21,2	23,1	22,9	25,0	25,0	27,7	27,7	29,5	29,6
	—	—	20,9	20,9	23,1	23,1	24,9	24,9	27,9	27,7	29,7	29,5
	—	—	21,0	21,0	22,9	23,2	25,1	25,2	28,0	27,9	29,5	29,5
	—	—	21,0	21,0	23,1	23,2	24,8	25,0	27,8	27,7	29,5	29,6
	—	—	21,0	21,0	23,6	23,0	25,0	25,0	27,8	27,8	29,5	29,5
Durchschnitt	20,0		21,0		23,0		25,0		27,8		29,5	
Verglichen mit	I = 20		I = 20		I = 20		I = 20		I = 20		I = 20	
Proz. d. Eiweißspaltung	0,0		4,8		13,0		20,0		28,1		32,2	

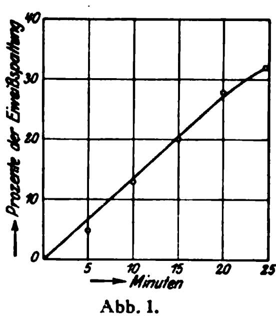


Abb. 1.

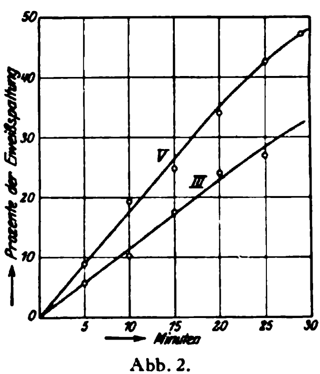


Abb. 2.

Verhältnis der Fermentkonzentrationen 3:5.

Tabelle II (zu Abb. 2, Kurve III).

Nr.	Ib	IIb	IIIb	IVb	Vb	VIb	VIIb
Minut. Spaltungszeit	0	5	10	15	20	25	30
	$p_H = 0{,}98$						
Nephelometerablesung	20,0	21,2	22,3	24,4	26,3	27,5	29,3
	—	21,1	22,3	24,3	26,2	27,3	29,4
	—	21,2	22,4	24,2	26,2	27,3	29,4
	—	21,2	22,3	24,1	26,4	27,4	29,1
	—	21,1	22,2	24,4	26,3	27,3	29,3
Durchschnitt .	20,0	21,2	22,3	24,3	26,3	27,4	29,3
Verglichen mit	Ib = 20	Ib = 20	Ib = 20	Ib = 20	Ib = 20	Ib = 20	Ib = 20
Proz. d. Eiweißspaltung . .	0,0	5,7	10,4	17,7	24,0	27,0	31,75

Tabelle III (zu Abb. 2, Kurve V).

Nr.	Ia	IIa	IIIa	IVa	Va	VIa	VIIa
Minut. Spaltungszeit	0	5	10	15	20	25	30
				$p_H = 0{,}97$			
Nephelometerablesung	20,0	22,0	24,7	26,7	30,5	35,1	38,3
	—	22,0	24,7	26,7	30,5	35,6	38,0
	—	22,0	24,6	26,4	30,5	35,0	38,2
	—	22,1	24,7	26,5	30,5	35,1	38,2
	—	22,0	24,7	26,7	30,5	35,0	38,2
Durchschnitt .	20,0	22,0	24,7	26,6	30,5	35,0	38,2
Verglichen mit	Ia = 20	Ia = 20	Ia = 20	Ia = 20	Ia = 20	Ia = 20	Ia = 20
Proz. d. Eiweißspaltung . .	0,0	9,1	19,0	24,8	34,4	42,9	47,65

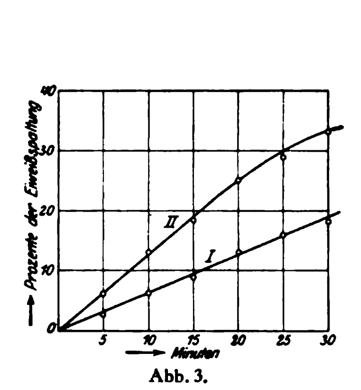


Abb. 3.

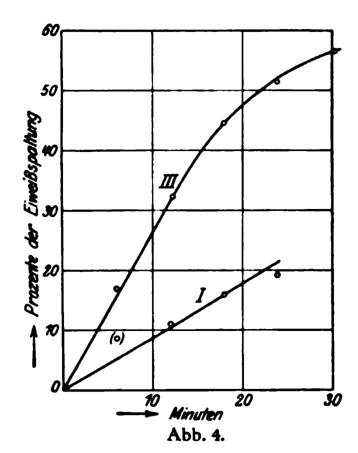


Abb. 4.

Verhältnis der Fermentkonzentrationen 1:2.

Tabelle IV (zu Abb. 3, Kurve I).

Nr.	Ia	IIa	IIIa	IVa	Va	VIa	VIIa
Minut. Spaltungszeit	0	5	10	15	20	25	30
				$p_H = 1{,}02$			
Nephelometerablesung	20,0	20,5	21,3	21,9	23,0	23,8	24,6
	—	20,5	21,3	21,9	23,0	23,7	24,6
	—	20,7	21,3	22,0	23,0	23,7	24,3
	—	20,6	21,3	22,0	22,9	23,9	24,6
	—	20,5	21,3	21,9	22,9	23,8	24,6
Durchschnitt .	—	20,6	21,3	21,95	23,0	23,8	24,6
Verglichen mit	Ia = 20	Ia = 20	Ia = 20	Ia = 20	Ia = 20	Ia = 20	Ia = 20
Proz. d. Eiweißspaltung . .	0,0	2,7	6,1	8,9	13,0	16,0	18,7

Tabelle V (zu Abb. 3, Kurve II).

Nr.	Ib	IIb	IIIb	IVb	Vb	VIb	VIIb
Minut. Spaltungszeit	0	5	10	15	20	25	30
				$p_H = 1{,}02$			
Nephelometer-ablesung	20,0	21,3	23,0	24,5	26,3	28,2	30,6
	—	21,3	23,1	24,5	26,5	28,0	30,5
	—	21,4	23,0	24,5	26,5	28,2	30,7
	—	21,2	23,0	24,5	26,4	28,2	30,6
	—	21,3	23,0	24,4	26,4	28,2	30,7
Durchschnitt .	20,0	21,3	23,0	24,5	26,4	28,2	30,6
Verglichen mit	Ib = 20	Ib = 20	Ib = 20	Ib = 20	Ib = 20	Ib = 20	Ib = 20
Proz. d. Eiweiß-spaltung . .	0,0	6,1	13,0	18,4	25,4	29,1	34,6

Verhältnis der Fermentkonzentrationen 1:3.

Tabelle VI (zu Abb. 4, Kurve I).

Nr.	Ib		IIb		IIIb		IVb		Vb		VIb	
Minuten Spaltungszeit	0		6		12		18		24		30	
	b	b_1	b	b_1	b	b_1	b	b_1	b	b_1	b	b_1
						$p_H = 1{,}01$						
Nephelometerablesung	20,0	20,0	22,0	21,9	22,5	22,5	23,9	23,6	24,7	24,9	—	—
	—	—	21,8	22,0	22,5	22,5	24,0	23,8	24,5	24,6	—	—
	—	—	22,0	22,0	22,6	22,6	23,9	23,8	24,6	24,4	—	—
	—	—	22,0	22,0	22,5	22,5	24,0	23,7	24,7	24,6	—	—
	—	—	22,0	21,9	22,5	22,5	24,0	23,8	24,6	24,6	—	—
	—	—	22,0	22,0	22,5	22,5	24,0	23,7	24,6	24,6	—	—
Durchschnitt	20,0		22,0		22,5		23,85		24,6		—	
Verglichen mit	Ib = 20		Ib = 20		Ib = 20		Ib = 20		Ib = 20		—	
Proz. d. Eiweißspaltung	0,0		9,1		11,1		16,1		18,7		—	

Tabelle VII (zu Abb. 4, Kurve III).

Nr.	Ia		IIa		IIIa		IVa		Va		VIa	
Minuten Spaltungszeit	0		6		12		18		24		30	
	a_1	a_2	a_1	a_2	a_1	a_2	a_1	a_2	a_1	a_2	a_1	a_2
						$p_H = 1{,}0$						
Nephelometerablesung	20	20	24,3	24,4	29,8	30,1	36,1	36,2	31,0	31,4	34,7	34,5
	—	—	24,0	24,2	29,3	30,2	36,0	36,4	30,7	31,3	34,4	34,5
	—	—	24,3	24,5	29,5	30,0	36,2	36,1	31,0	31,4	34,6	34,5
	—	—	24,1	24,4	29,7	30,0	36,3	36,4	31,2	31,4	34,3	34,7
	—	—	24,0	24,3	29,5	29,9	36,2	36,3	31,0	31,3	34,5	34,6
	—	—	24,1	24,2	29,6	30,0	36,2	36,3	31,0	31,4	34,5	34,5
Durchschnitt	20		24,15		29,8		36,25		31,2		34,5	
Verglichen mit	Ia = 20		Ia = 20		Ia = 20		Ia = 20		Ia = 15		Ia = 15	
Proz. d. Eiweißspaltung	0,0		17,0		32,9		44,8		51,9		56,5	

Verhältnis der Fermentkonzentrationen 1:4.

Tabelle VIII (zu Abb. 5, Kurve I).

Nr.	Ia	IIa	IIIa	IVa	Va	VIa	VIIa
Minut. Spaltungszeit	0	5	10	15	20	25	30
				$p_H = 0{,}94$			
Nephelometer-ablesung	20,0	20,4	21,2	21,9	23,5	24,2	25,7
	—	20,2	21,2	21,9	23,4	24,1	25,7
	—	20,2	21,3	21,8	23,7	23,8	25,8
	—	20,2	21,2	22,0	23,5	23,9	25,7
	—	20,2	21,2	21,8	23,4	23,8	25,7
Durchschnitt .	20,0	20,25	21,2	21,9	23,5	23,9	25,7
Verglichen mit	Ia = 20	Ia = 20	Ia = 20	Ia = 20	Ia = 20	Ia = 20	Ia = 20
Proz. d. Eiweiß-spaltung . .	0,0	1,2	5,7	8,7	14,8	16,3	22,2

Tabelle IX (zu Abb. 5, Kurve IV).

Nr.	Ib	IIb	IIIb	IVb	Vb	VIb	VIIb
Minut. Spaltungszeit	0	5	10	15	20	25	30
				$p_H = 0{,}96$			
Nephelometer-ablesung	20,0	24,3	29,4	31,7	41,6	31,7	35,0
	—	24,0	29,3	31,4	41,4	32,0	35,0
	—	24,0	29,0	31,6	41,4	31,9	35,2
	—	24,1	29,1	31,6	41,5	32,0	35,3
	—	24,0	29,1	31,7	41,5	32,0	35,2
Durchschnitt .	20,0	24,1	29,2	31,6	41,5	31,9	35,2
Verglichen mit	Ib = 20	Ib = 20	Ib = 20	Ib = 20	Ib = 20	Ib = 15	Ib = 15
Proz. d. Eiweiß-spaltung . .	0,0	17,0	31,5	36,7	51,8	53,0	57,4

Wie die gegebenen Tabellen und Abbildungen zeigen, ermöglichen die gefundenen Werte eine gute graphische Darstellung des Verlaufes von peptischen Spaltungen.

Es ergibt sich aus allen Abbildungen, daß der Beginn der Spaltung ein geradliniger ist, d. h. daß in der gleichen Zeit die gleichen Mengen Eiweiß umgesetzt werden. Im Verlaufe der Spaltung werden die umgesetzten Eiweißmengen geringer, und die geradlinige Kurve geht in eine gekrümmte, sich allmählich abflachende Linie über.

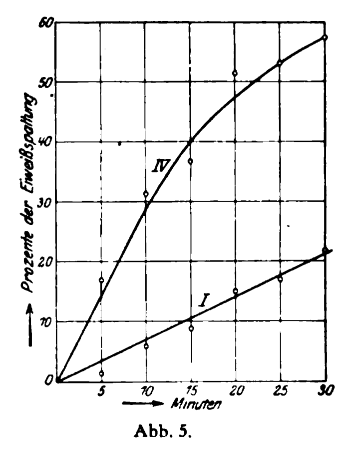


Abb. 5.

Diese Eigenart der Spaltungskurven ordnet die Kurven der peptischen Verdauung einer großen Zahl gleichgearteter, bei anderen Fermentspaltungen beobachteter Bilder zu[1]). Hiermit stimmt überein, daß der Beginn der Abflachung der Kurven bei Anwendung größerer Fermentmengen eher erfolgt als bei Anwendung geringerer Mengen.

Um die Eigenschaften der Spaltungsbilder noch besser vergleichen zu können, seien im folgenden Zusammenstellungen gegeben, die die Zahlenverhältnisse, die aus dem Vergleich der stetigen Kurven folgen, zusammenfassen.

Tabelle X (entsprechend Abb. 2).

Minuten Spaltungszeit	Umges. Eiweißmenge in Proz. der Kurve III	In je 5 Minuten umges. Eiweißmenge in Proz. der Kurve III	Umges. Eiweißmenge in Proz. der Kurve V	In je 5 Minuten umgesetzte Eiweißmenge d. Kurve V	Proz. Umsatz	Verhältnis der Umsatzzeiten der Kurven V : III	Verhältnis der Fermentkonzentration III : V
5	5,75	5,75	8,75	8,75	5	8,5 : 13 = 0,65	0,6
10	11,5	5,75	17,5	8,75	10	17 : 26 = 0,65	0,6
15	17,25	5,75	26,25	8,75	15	35,5 : 39 = 0,65	0,6
20	23,0	5,75	35,0	8,75	20	34 : 42 = 0,65	0,6
25	28,5	5,5	42,5	7,5	25	42,5 : 65 = 0,65	0,6
30	32,5	4,0	47,5	5,0	—	51 : 79 = 0,65	0,6

Tabelle XI (entsprechend Abb. 3).

Minuten Spaltungszeit	Umges. Eiweißmenge in Proz. der Kurve I	In je 5 Minuten umges. Eiweißmenge in Proz. der Kurve I	Umges. Eiweißmenge in Proz. der Kurve II	In je 5 Minuten umgesetzte Eiweißmenge d. Kurve II	Proz. Umsatz	Verhältnis der Umsatzzeiten der Kurven II : I	Verhältnis des Fermentkonzentration I : II
5	3,15	3,15	6,25	6,25	5	7 : 14 = 0,5	0,5
10	6,3	3,15	12,5	6,25	10	14 : 28 = 0,5	0,5
15	9,45	3,15	18,75	6,25	15	35,5 : 71 = 0,5	0,5
20	12,6	3,15	25	6,25	20	47,5 : 95 = 0,5	0,5
25	15,75	3,15	30	5,0	—	—	—
30	18,9	3,15	34	4,0	—	—	—

Tabelle XII (entsprechend Abb. 4).

Minuten Spaltungszeit	Umges. Eiweißmenge in Proz. der Kurve I	In je 5 Minuten umgesetzte Eiweißmenge d. Kurve I	Umges. Eiweißmenge in Proz. der Kurve III	In je 5 Minuten umgesetzte Eiweißmenge d Kurve III	Proz. Umsatz	Verhältnis der Umsatzzeiten der Kurven III : I	Verhältnis der Fermentkonzentration I : III
5	4,4	4,4	13,25	13,25	5	5,5 : 17 = 0,324	0,333
10	8,8	4,4	26,5	13,25	10	12 : 34,5 = 0,348	0,333
15	13,2	4,4	39	12,5	15	17 : 51 = 0,33	0,333
20	17,6	4,4	52,5	13,5	20	22,5 : 67 = 0,336	0,333
25	22	4,4	56,5	4,5	—	—	—
30	—	—	—	—	—	—	—

[1]) Bezüglich des Pepsins vgl. hierzu namentlich die Arbeiten von *J. H. Northrop*, The Journal of General Physiologie **2**, 113, 471, 1919; **4**, 245, 1921.

Tabelle XIII (entsprechend Abb. 5).

Minuten Spaltungszeit	Umges. Eiweißmenge in Proz. der Kurve I	In je 5 Minuten umgesetzte Eiweißmenge d. Kurve I	Umges. Eiweißmenge in Proz. der Kurve IV	In je 5 Minuten umgesetzte Eiweißmenge d. Kurve IV	Proz. Umsatz	Verhältnis der Umsatzzeiten der Kurve IV : I	Verhältnis der Fermentkonzentration I : IV
5	3,5	3,5	15	15	5	5,5 : 22 = 0,25	0,25
10	7,0	3,5	29	14	10	10,5 : 43 = 0,244	0,25
15	10,5	3,5	40	11	15	15,5 : 63 = 0,246	0,25
20	14,0	3,5	47,5	7,5	20	20,5 : 84 = 0,244	0,25
25	17,5	3.5	53	5,5	—	—	—
30	21,2	3,7	57,5	4,5	—	—	—

In diesen tabellarischen Übersichtsbildern ist einmal die Menge Eiweiß angegeben, die in einer bestimmten Zeiteinheit — hier 5 Minuten — umgesetzt wird. Sie erläutert zahlenmäßig den geradlinigen Beginn des Eiweißspaltungsverlaufes.

Des weiteren ist aber auch das Verhältnis der Spaltungszeiten zweier Kurven bei gleichem Eiweißumsatz gegeben. Und hier zeigt es sich, *daß die Spaltungszeiten bei gleichem Umsatz sich umgekehrt verhalten wie die Fermentkonzentrationen.*

Es wurde des weiteren versucht, den Einfluß festzustellen, den Änderungen der Substratmenge bei gleicher Fermentmenge auf die Spaltung ausüben.

2. Variation der Substratmenge bei gleicher Fermentmenge.

Die Substratmengen wurden im Verhältnis 4 : 5, 3 : 4, 4 : 6, 4 : 7 und 1 : 2 variiert. Es wurden hierzu Mengen zwischen 15 und 30 ccm Serumverdünnung 1 : 25 bei einem Endvolumen von 75 ccm angewandt. Die anderen Bedingungen waren die gleichen wie oben: 2 ccm Pepsinlösung 1 : 500, Azidität gleich einer n/10 HCl.

Substratverhältnis 4:5.

Tabelle XIV (zu Abb. 6, Kurve V).

Nr.	Ib	IIb	IIIb	IVb	Vb	VIb	VIIb
Minut. Spaltungszeit	0	5	10	15	20	25	30
	$p_H = 0{,}95$						
Nephelometerablesung	20,0	21,0	21,7	23,2	25,0	26,0	27,0
	—	21,2	22,0	23,1	28,0	26,0	27,5
	—	21,3	21,8	23,1	25,0	26,0	27,2
	—	21,2	21,9	23,1	25,0	25,9	27,4
	—	21,3	21,8	23,0	25,0	26,0	27,4
Durchschnitt .	20,0	21,3	21,9	23,1	25,0	26,0	27,4
Verglichen mit	Ib = 20	Ib = 20	Ib = 20	Ib = 20	Ib = 20	Ib = 20	Ib = 20
Proz. d. Eiweißspaltung . .	0,0	6,1	8,7	13,4	20,0	23,1	27,0

Tabelle XV
(zu Abb. 6, Kurve IV).

Nr.	Ia	IIa	IIIa	IVa	Va	VIa	VIIa
Minut. Spaltungszeit	0	5	10	15	20	25	30
	$p_H = 0{,}95$						
Nephelometer-ablesung	20,0	22,4	24,4	26,0	27,4	28,9	31,0
	—	22,3	24,4	25,9	27,8	28,9	31,0
	—	22,2	24,6	26,0	27,6	29,0	31,2
	—	22,3	24,3	26,0	27,7	29,0	31,2
	—	22,4	24,4	25,9	27,7	28,9	31,3
Durchschnitt .	20,0	22,3	24,4	26,0	27,7	28,9	31,2
Verglichen mit	Ia = 20	Ia = 20	Ia = 20	Ia = 20	Ia = 20	Ia = 20	Ia = 20
Proz. d. Eiweiß-spaltung . .	0,0	10,2	18,0	23,1	27,8	31,8	35,9

Substratverhältnis 3:4.

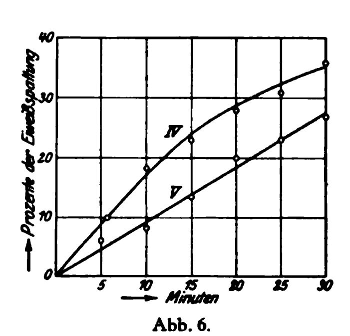


Abb. 6.

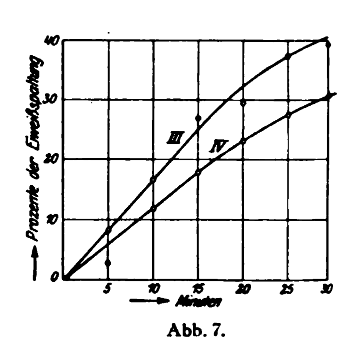


Abb. 7.

Tabelle XVI
(zu Abb. 7, Kurve IV).

Nr.	Ib	IIb	IIIb	IVb	Vb	VIb	VIIb
Minut. Spaltungszeit	0	5	10	15	20	25	30
	$p_H = 0{,}91$						
Nephelometer-ablesung	—	20,3	22,6	24,5	26,0	27,8	29,0
	—	20,5	22,8	24,7	26,4	27,6	29,1
	—	20,8	22,7	24,2	26,0	27,5	29.0
	—	20,8	22,5	24,1	25,8	27,5	29,0
	—	20,5	22.9	24,2	26,1	27,6	29.1
Durchschnitt .	—	20,6	22,7	24,3	26,0	27,6	29,0
Verglichen mit	—	20	20	20	20	20	20
Proz. d. Eiweiß-spaltung . .	—	2,9	11,9	17,7	23,1	27,5	31,0

Tabelle XVII (zu Abb. 7, Kurve III).

Nr.	Ia	IIa	IIIa	VIa	Va	VIa	VIIa
Minut. Spaltungszeit	0	5	10	15	20	25	30
				$p_H = 0{,}91$			
Nephelometerablesung	—	21,9	23,8	27,3	28,0	30,0	32,7
	—	21,5	24,0	27,3	28,3	30,3	33,1
	—	21,8	24,1	27,0	28,3	30,6	33,0
	—	21,8	24,0	27,1	28,3	30,7	33,0
	—	21,8	24,0	27,4	28,4	30,4	33,0
Durchschnitt .	—	21,8	24,0	27,2	28,3	30,4	33,0
Verglichen mit	—	20	20	20	20	20	20
Proz. d. Eiweißspaltung . .	—	8,3	16,7	26,8	29,3	34,2	39,3

Substratverhältnis 4:5:6.

Tabelle XVIII (zu Abb. 8, Kurve VI).

Nr.	Ic	IIc	IIIc	IVc	Vc	VIc	VIIc
Minut. Spaltungszeit	0	5	10	15	20	25	30
				$p_H = 0{,}92$			
Nephelometerablesung	—	21,4	22,0	22,7	24,0	24,8	26,5
	—	21,3	22,1	23,0	24,0	25,0	26,8
	—	21,3	22,0	22,9	24,0	25,0	26,5
	—	21,1	22,0	22,8	24,1	25,0	26,5
	—	21,3	21,9	22,8	24,1	25,2	26,5
Durchschnitt .	—	21,3	22,0	22,8	24,0	25,0	26,5
Verglichen mit	—	20	20	20	20	20	20
Proz. d. Eiweißspaltung . .	—	7,0	9,1	12,3	16,7	20,0	24,6

Tabelle XIX (zu Abb. 8, Kurve V).

Nr.	Ib	IIb	IIIb	IVb	Vb	VIb	VIIb
Minut. Spaltungszeit	0	5	10	15	20	25	30
				$p_H = 0{,}92$			
Nephelometerablesung	—	21,9	22,9	24,5	26,0	27,1	27,9
	—	22,0	23,2	24,5	26,2	26,5	27,5
	—	21,9	23,2	24,8	26,2	26,5	27,4
	—	21,8	23,2	24,6	26,4	26,8	27,6
	—	21,8	23,3	24,4	26,0	26,9	27,6
Durchschnitt .	—	21,9	23,2	24,5	26,2	26,8	27,6
Verglichen mit	—	20	20	20	20	20	20
Proz. d. Eiweißspaltung . .	—	8,7	13,8	18,4	23,7	25,4	27,5

Tabelle XX (zu Abb. 8, Kurve IV).

Nr.	Ia	IIa	IIIa	IVa	Va	VIa	VIIa
Minut. Spaltungszeit	0	5	10	15	20	25	30
	$p_H = 0{,}92$						
Nephelometerablesung	—	22,7	23,3	25,8	27,0	27,8	29,9
	—	22,5	23,3	25,6	26,8	27,6	29,8
	—	22,5	23,5	25,5	27,0	27,9	30,0
	—	22,6	23,3	25,4	27,0	28,0	29,6
	—	22,5	23,3	25,5	27,0	27,8	29,9
Durchschnitt .	—	22,5	23,3	25,5	27,0	27,8	29,9
Verglichen mit	—	20	20	20	20	20	20
Proz. d. Eiweißspaltung . .	—	11,1	14,2	21,9	25,9	28,1	33,3

Substratverhältnis 6:7.

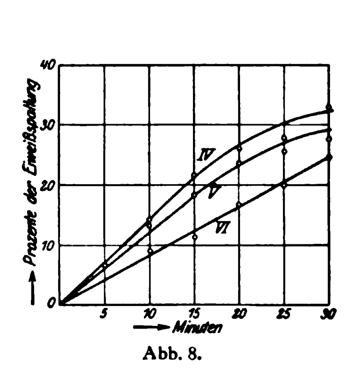


Abb. 8.

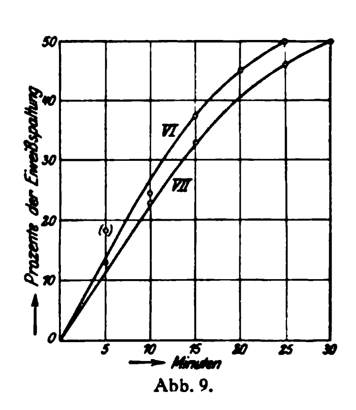


Abb. 9.

Tabelle XXI (zu Abb. 9, Kurve VII).

Nr.	Ib	IIb	IIIb	IVb	Vb	VIb	VIIb
Minut. Spaltungszeit	0	5	10	15	20	25	30
	$p_H = 1{,}06$						
Nephelometerablesung	—	23,0	26,3	30,1	33,0	37,6	29,8
	—	23,2	25,8	30,2	33,1	37,2	29,8
	—	22,8	25,8	29,8	32,6	37,0	29,9
	—	23,0	26,0	29,9	32,8	37,2	29,9
	—	23,0	26,0	29,8	32,6	37,2	30,0
Durchschnitt .	—	23,0	26,0	29,9	32,8	37,2	29,9
Verglichen mit	—	20	20	20	20	20	15
Proz. d. Eiweißspaltung . .	—	13,0	23,0	33,1	39,0	46,2	50,0

Tabelle XXII (zu Abb. 9, Kurve VI).

Nr.	Ia	IIa	IIIa	IVa	Va	VIa	VIIa
Minut. Spaltungszeit	0	5	10	15	20	25	30
				$p_H = 1{,}06$			
Nephelometer-ablesung	—	23,8	26,5	32,0	36,3	40,0	33,6
	—	23,9	26,4	31,8	36,2	39,9	33,8
	—	23,9	26,6	31,9	36,3	39,8	34,0
	—	24,0	26,3	31,6	36,2	39,9	34,0
	—	23,9	26,6	31,9	36,0	39,8	34,2
Durchschnitt .	—	23,9	26,5	31,9	36,2	39,9	34,0
Verglichen mit	—	20	20	20	20	20	15
Proz. d. Eiweiß-spaltung . .	—	16,3	24,5	37,3	44,8	49,9	55,9

Tabelle XXIII (zu Abb. 10, Kurve II).

Nr.	Ia	IIa	IIIa	IVa	Va	VIa	VIIa
Minut. Spaltungszeit	0	5	10	15	20	25	30
				$p_H = 1{,}03$			
Nephelometer-ablesung	20,0	22,5	24,5	27,4	29,7	32,5	36,1
	—	22,5	24,3	27,5	29,5	32,2	35,8
	—	22,4	24,4	27,5	29,3	32,5	35,9
	—	22,4	24,5	27,4	29,5	32,5	36,0
	—	22,5	24,5	27,5	29,5	32,5	36,0
Durchschnitt .	20,0	22,5	24,4	27,5	29,5	32,5	36,0
Verglichen mit	Ia = 20	Ia = 20	Ia = 20	Ia = 20	Ia = 20	Ia = 20	Ia = 20
Proz. d. Eiweiß-spaltung . .	0,0	11,0	18,0	27,2	32,1	38,4	44,3

Tabelle XXIV (zur Abb. 10, Kurve I).

Nr.	Ib	IIb	IIIb	IVb	Vb	VIb	VIIb
Minut. Spaltungszeit	0	5	10	15	20	25	30
				$p_H = 1{,}03$			
Nephelometer-ablesung	10,0	16,8	19,0	21,7	24,4	25,8	28,0
	—	16,9	19,0	21,7	24,6	25,9	28,0
	—	16,7	18,8	21,6	24,4	26,1	28,0
	—	16,8	19,1	21,6	24,3	26,2	28,0
	—	16,8	19,0	21,7	24,4	25,7	28,0
Durchschnitt .	10,0	16,8	19,0	21,75	24,4	25,9	28,0
Verglichen mit	Ib = 10	Ib = 10	Ib = 10	Ib = 10	Ib = 10	Ib = 10	Ib = 10
Proz. e. Eiweiß-spaltung . .	0,0	40,4	47,3	53,8	58,8	61,2	64,2

Aus diesen Versuchen und graphischen Darstellungen folgt, daß eine einfache Beziehung zwischen zwei Spaltungen, bei denen die Substratmenge die Variable ist, nicht festzustellen ist.

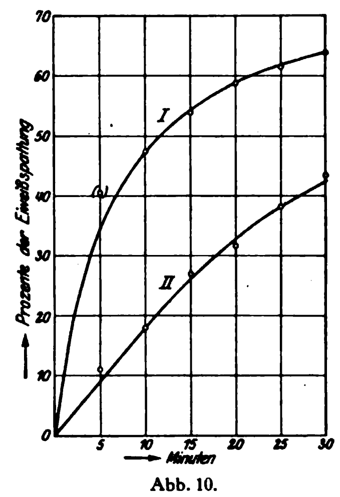


Abb. 10.

Alle Kurven bestätigen die bei der Variation der Fermentmengen gegebene Regel des geradlinigen Anfangsverlaufes der Spaltung, zeigen aber keine weitere Gesetzmäßigkeit. Keinesfalls besteht die bei manchen Spaltungen beobachtete Regel, daß die absoluten, in gleichen Zeiten umgesetzten Substratmengen gleich sind. Die Kurven lassen nur erkennen, daß, je kleiner das Verhältnis der Substratmengen, desto kleiner — und zwar in steigendem Maße — auch das Verhältnis der Spaltungszeiten bei gleichem Umsatz ist.

Der durchschnittliche Fehler der Methode beträgt *rund 1 Proz.*

Zusammenfassung.

Die nephelometrische Eiweißbestimmung wird zum Studium fermentativer Eiweißspaltung speziell der peptischen Verdauung verwandt.

Die Methode ist einfach und ermöglicht Reihenuntersuchungen in kürzester Zeit (1 bis 2 Stunden).

Es wurde die peptische Verdauung bei Variation der Fermentmengen bei gleichbleibender Substratmenge studiert.

Der Verlauf der Spaltung ist anfangs ein geradliniger. Nach stärkerer Spaltung (etwa 25 bis 30 Proz.) geht die Kurve in eine gekrümmte, sich abflachende Linie über.

Des weiteren zeigte sich, daß sich die Spaltungszeiten bei gleichem Umsatz umgekehrt verhielten wie die Fermentkonzentrationen. Auch hier ordnet sich die peptische Verdauung den bei anderen Spaltungen beobachteten Gesetzmäßigkeiten ein. Bei Variation der Substratmenge bei gleichbleibender Fermentmenge ließ sich eine einfache Gesetzmäßigkeit nicht ableiten.

Herrn Dr. *Oelsner*, der uns bei einem Teile der Arbeit sehr wesentlich unterstützte, sei unser bester Dank ausgesprochen. Die Untersuchungen werden fortgesetzt.

Studien zur Zellatmung.

II. Mitteilung.

Die Wirkung von Chinin auf die Atmung lebender Hefezellen.

Von

P. Rona und **K. Grassheim.**

(Aus der chemischen Abteilung des pathologischen Instituts der Universität; Charité Berlin.)

(Eingegangen am 21. Juni 1923.)

Mit 25 Abbildungen im Text.

I. In der ersten Mitteilung[1]) haben wir die physiologischen Bedingungen des Atmungsprozesses lebender Hefezellen eingehender untersucht und die Grundlagen gewonnen, die ein Studium der Einwirkung verschiedener, chemisch gut definierter Verbindungen auf denselben gestatten. Zunächst haben wir nun die Wirkung des Chinins (angewandt wurde stets Chinin. hydrochloricum) untersucht.

Die Methode war die in der ersten Mitteilung angewandte; gearbeitet wurde mit dem dort benutzten Stamm von Torula pulcherrima. Die Zusammensetzung der einzelnen Proben war stets: 4 ccm der Pufferlösung (Phosphat- oder Acetatgemisch), 4 ccm der Hefesuspension und 1 ccm der Chinin. hydrochloricum- bzw. in den Kontrollen 1 ccm der Pufferlösung. Als Konzentration der Chininlösung ist stets diejenige der zugesetzten Chininlösung, nicht die Konzentration des Gesamtgemisches an Chinin angegeben. In das Gefäß zur Adsorption der entwickelten CO_2 kam 1 ccm 33proz. Natronlauge. Die Hefesuspension wurde stets zuletzt zum Puffer-Chiningemisch zugesetzt, und zwar, wenn nicht anders angegeben, unmittelbar vor dem Einsetzen der Manometer in das Wasserbad.

Vorversuche haben ergeben, daß m/100 Chinin. hydrochlor. weder bei stark saurer (bei p_H 3,99, Acetatpuffer) noch bei alkalischer Reaktion (p_H 7,63, Phosphatpuffer) auch nach längerer Einwirkung (bis 1½ Stunden) die Atmung der Hefezellen zu beeinflussen vermag. Deutlich war hingegen die Hemmung unter den gegebenen Versuchsbedingungen bereits bei m/50 Chininlösung[2]).

[1]) Vgl. diese Zeitschr. **184**, 146, 1922.

[2]) Statt Chinin. hydrochlor. wird in der Arbeit der Kürze halber stets „Chinin“ geschrieben.

Zur Feststellung der Abhängigkeit der Atmungshemmung von der Wasserstoffionenkonzentration des Mediums wandten wir eine m/25 Chininlösung an. Um eine etwaige Ausfällung des Chinins zu verhindern, pufferten wir mit Acetatgemischen die Lösungen auf eine verhältnismäßig stark saure Reaktion, wobei wir jedoch noch innerhalb der in der ersten Mitteilung festgestellten Grenzen des Optimums für die Atmung geblieben sind. Die Versuche sind in den folgenden Tabellen (Versuch 1 bis 3) und Abb. 1 bis 3 wiedergegeben.

Versuch 1 (Abb. 1).

17. Oktober 1922. Kultur vom 12. Oktober. $p_H = 5{,}12$. Zu I und III Chinin. Beginn $1^h 49'$.

Zeit	O_2-Verbrauch in ccm			Hemmung
	I.	II.	III.	Proz.
$1^h 59'$	3,62	4,16	3,70	12,3
2 09	5,87	7,56	6,16	20,5
2 29	12,02	15,32	11,95	21,6

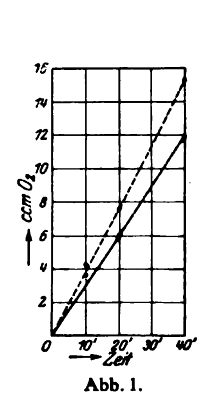


Abb. 1.

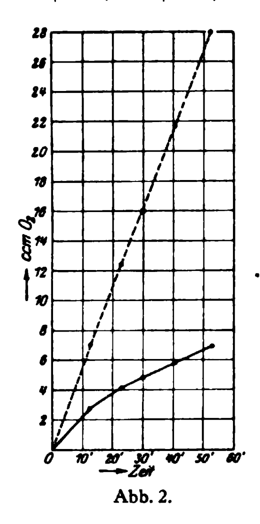


Abb. 2.

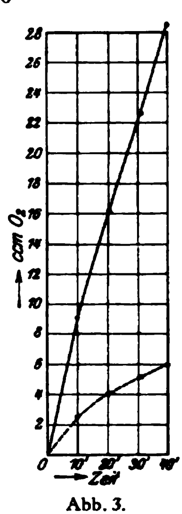


Abb. 3.

Versuch 2 (Abb. 2).

18. Oktober 1922. Kultur vom 13. Oktober. Dieselbe Anordnung. $p_H = 5{,}38$. Beginn $1^h 42'$.

Zeit	O_2-Verbrauch in ccm		Hemmung
	I.	II.	Proz.
$1^h 54'$	2,70	7,04	61,6
2 05	4,10	12,42	67,0
2 12	4,78	16,14	70,4
2 23	5,78	21,71	73,1
2 35	6,97	28,16	75,3

Versuch 3 (Abb. 3). 19. Oktober 1922. Kultur vom 16. Oktober. In I und III Chinin. $p_H = 5{,}93$. Beginn 11h 20′.

Zeit	O_2-Verbrauch in ccm			Hemmung
	I.	II.	III.	Proz.
11h 30′	2,31	9,09	2,69	74,6
11 40	3,77	16,19	4,3	75,0
11 51	4,64	23,58	5,65	78,2
12 0	5,48	28,50	6,27	79,4

Die Versuche zeigen, daß die Hemmung der Atmung mit steigendem p_H, d. h. bei zunehmender Alkalität zunimmt, ferner, daß sie nicht sofort ihre endgültige Höhe erreicht, sondern im Laufe der Giftwirkung ansteigt.

Genauer schildern die hier vorliegenden Verhältnisse die folgenden Versuche. Bei diesen wurde ebenfalls stets eine m/25 Chininlösung angewandt. Die Zusammensetzung des Gesamtgemisches war wie in den vorigen Versuchen. Unter „Gesamtzeit" ist die Zeit vom Zusatz der Hefesuspension zum Chinin-Puffergemisch bis zur jeweiligen Ablesung zu verstehen.

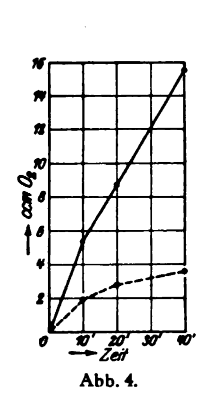


Abb. 4.

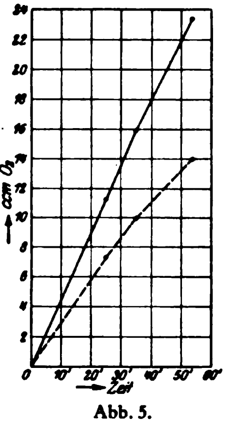


Abb. 5.

Versuch 4 (Abb. 4).

20. Oktober 1922. Kultur vom 17. Oktober. Zusatz der Hefesuspension zu den Pufferlösungen mit Chinin (in I und III) und ohne Chinin (in II): 10h 55′. (Der Zusatz erfolgte auch in den folgenden Versuchen stets gleichzeitig.) $p_H = 5{,}67$. Beginn: 12h 15′.

Zeit	O_2-Verbrauch in ccm			Hemmung	Gesamtzeit
	I.	II.	III.	Proz.	
12h 25′	2,09	5,38	1,66	65,6	
12 35	2,91	8,69	2,49	68,9	
12 55	3,96	15,36	3,15	76,9	2 Stunden

Versuch 5 (Abb. 5). 24. Oktober 1922. Kultur vom 20. Oktober. In III und IV Chinin. Zusatz: 12h 05′. Beginn: 1h 55′. $p_H = 5{,}17$.

Zeit	O_2-Verbrauch in ccm				Hemmung	Gesamtzeit
	I.	II.	III.	IV.	Proz.	
2h 20′	11,02	11,26	7,45	7,14	34,3	1h 50′
2 30	15,61	15,99	10,25	9,57	33,0	
2 49	23,07	23,65	14,18	13,61	40,4	2 44

Versuch 6 (Abb. 6).

25. Oktober 1922. Kultur vom 21. Oktober. In III und IV Chinin. Zusatz: 11h 35'. Beginn: 1h 57'. $p_H = 6,1$.

Zeit	O_2-Verbrauch in ccm				Hemmung	Gesamtzeit
	I.	II.	III.	IV.	Proz.	
2h07'	6,52	6,32	1,06	1,0	84,0	2h 22'
2 18	12,81	12,53	1,45	1,33	89,1	
2 27	18,29	18,32	2,07	1,74	89,7	
2 37	23,53	23,53	2,27	1,99	90,0	2 57

Versuch 7 (Abb. 7).

26. Oktober 1922. Kultur vom 23. Oktober. In II Chinin. Zusatz: 11h 40'. Beginn: 1h 32'. $p_H = 4,87$.

Zeit	O_2-Verbrauch in ccm		Hemmung	Gesamtzeit
	I.	II.	Proz.	
1h43'	2,80	2,42	13,6	2h03'
1 52	4,49	4,17	7,4	
2 12	6,94	6,42	7,5	
2 22	9,20	8,4	8,0	2 44

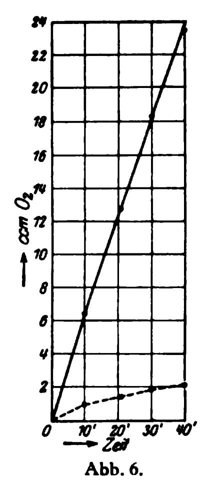


Abb. 6.

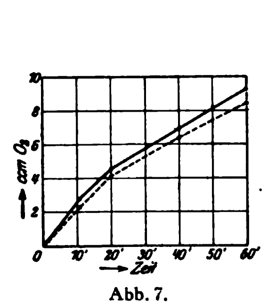


Abb. 7.

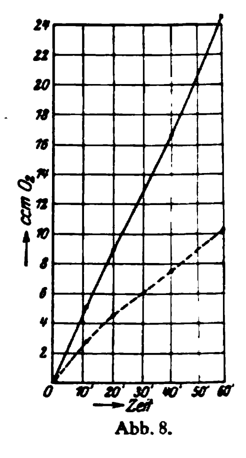


Abb. 8.

Versuch 8 (Abb. 8).

26. Oktober 1922. Kultur vom 23. Oktober. In II Chinin. Zusatz: 11h 40'. Beginn: 1h 32'. $p_H = 5,4$.

Zeit	O_2-Verbrauch in ccm		Hemmung	Gesamtzeit
	I.	II.	Proz.	
1h43'	5,07	2,83	44,2	2h03'
1 52	8,98	4,53	49,6	
2 12	16,66	7,55	54,7	
2 22	24,43	10,29	57,9	2 44

Versuch 9 (Abb. 9).

27. Oktober 1922. Kultur vom 24. Oktober. In II Chinin. Zusatz: 11h 30'. Beginn: 1h 14'. $p_H = 6,2$.

Zeit	O_2-Verbrauch in ccm I.	O_2-Verbrauch in ccm II.	Hemmung Proz.	Gesamtzeit
1h28'	9,11	0,85	90,7	1h58'
1 42	17,65	1,21	93,3	
1 52	24,18	1,46	93,9	
2 02	30,64	1,58	94,9	2 32

In Übereinstimmung mit den vorherigen Versuchen zeigen diese, daß 2 Stunden nach Zusatz des Chinins zur Zellsuspension die Zunahme der Atmungshemmung mit der Zeit meist noch zu beobachten ist. Nur in den Fällen, wo bei der entsprechenden H-Ionenkonzentration die Hemmung an sich sehr gering oder sehr stark ist, ist bereits in der Beobachtungszeit eine gleichbleibende Hemmungsgröße zu verzeichnen.

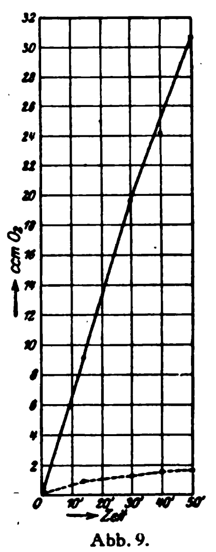


Abb. 9.

In den folgenden in dieser Richtung angestellten Versuchen wurde die Technik insofern geändert, daß nach jedesmaliger Ablesung der Hahn der Manometer wieder geöffnet, die Manometer eine kurze Zeit bei offenem Hahn abermals geschüttelt, darauf die Hähne wiederum geschlossen und nach durchschnittlich $\frac{1}{4}$ Stunde die Menge des verbrauchten Sauerstoffs gemessen wurde. Durch Feststellung des O_2-Verbrauches bei der Atmung der Zellen ohne und mit Zusatz von Chinin erhielten wir die prozentuale Größe der Vergiftung zu verschiedenen Zeiten, indem die Atmungsgröße der nicht vergifteten Zellen gleich 100 gesetzt wurde. Angewendet wurde eine m/25 Chininlösung.

Versuch 10.

10. Dezember 1922. Kultur vom 10. Dezember. Zusatz: 12h 20'. $p_H = 5,94$.

Zeit	Hemmung Proz.	Gesamtzeit	O_2-Verbrauch in ccm mit Chinin	O_2-Verbrauch in ccm ohne Chinin
1h32'	55,5	1h12'	4,1	9,25
1 43	58,1	1 23	8,8	21,0
1 58	67,0	1 38	3,4	10,1
2 08	65,9		7,9	21,5
1h17' bis 2 25	67,0	2 05	3,4	10,2

Versuch 11.

18. Dezember 1922. Kultur vom 13. Dezember. Zusatz: 11ʰ 30′. $p_H = 5,74$.

Zeit	Hemmung Proz.	Gesamtzeit	O_2-Verbrauch in ccm ohne Chinin	O_2-Verbrauch in ccm mit Chinin
12ʰ08′	44,8	38′	6,49	3,4
12 18	48,4		13,51	6,84
12 28	52,1		20,25	9,78
12ʰ49′ bis 1 0	60,4		8,2	3,2
1 15	62,0		18,6	7,12
1 25	61,8	1ʰ55	25,0	9,8

Versuch 12 (Abb. 10).

19. Dezember 1922. Kultur vom 16. Dezember. Zusatz: 11ʰ 05′. $p_H = 5,8$.

Zeit	Hemmung Proz.	Gesamtzeit	O_2-Verbrauch in ccm ohne Chinin	O_2-Verbrauch in ccm mit Chinin
11ʰ41′	41,5	36′	9,54	5,7
11 52	46,0		19,6	10,59
12 01	50,2		28,14	14,0
12ʰ22′ bis 12 32	62,5		7,7	2,9
12 44	63,0		17,4	6,51
1 „ 1 15	62,8	2ʰ10	8,1	3,03

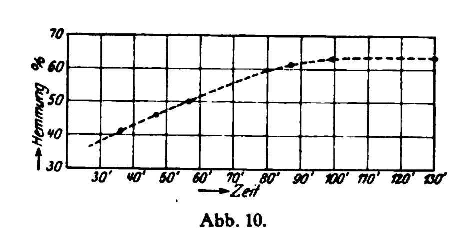


Abb. 10.

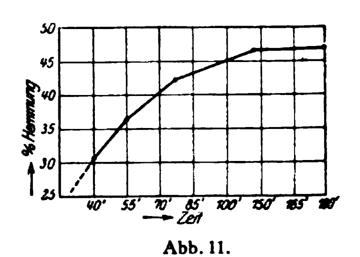


Abb. 11.

Versuch 13 (Abb. 11).

20. Dezember 1922. Kultur vom 16. Dezember. Zusatz: 11ʰ 35′. $p_H = 5,42$.

Zeit	Hemmung Proz.	Gesamtzeit	O_2-Verbrauch in ccm mit Chinin	O_2-Verbrauch in ccm ohne Chinin
12ʰ15′	31,3	40′	6,52	9,49
12 30	38,0		12,93	20,83
12ʰ39′ bis 12 52	44,3		5,59	10,04
1 13 „ 1 25	47,1	1ʰ50	4,43	8,37
1 35	46,2		8,62	16,0
1 55 „ 2 10	47,4	2 05	4,89	9,3

Versuch 14.

4. Dezember 1922. Kultur vom 28. November. Zusatz: $12^h 20'$. Beginn: 1^h. $p_H = 5,10$.

Zeit	Hemmung Proz.	Gesamtzeit	O_2-Verbrauch in ccm mit Chinin	O_2-Verbrauch in ccm ohne Chinin
1^h	15,8	44'	4,1	4,9
1 21'	17,7		7,95	9,54
1 31	20,0		11,78	14,5
1 41	21,6		14,9	18,81
1 51	23,8		18,40	23,98
$1^h 54'$ bis 2 05	32,1		3,72	5,34
2 15	33,3			
2 25	33,2	$2^h 05$		

Aus diesen Versuchen ergibt sich, daß die Hemmung der Atmung nach einer gewissen Zeit stationär wird. Diese bestimmte Höhe der „Giftwirkung" hängt von dem p_H des Gemisches ab; mit zunehmendem p_H ist sie größer. Wie diese „absolute" Hemmung durch m/25 Chininlösung den verschiedenen p_H zugeordnet ist, zeigt die Abb. 12, bei der auf der Abszisse die p_H, auf der Ordinate die prozentischen Hemmungen aufgetragen sind. Dieses Verhalten spricht dafür, daß die Vergiftung von der Chininbase herrührt. Die progressive Atmungshemmung bis zu dem jeweiligen Endzustande ließe sich mit Permeabilitätsvorgängen erklären: es wandert mit der Zeit immer mehr Chininbase durch die Zellmembran, bis sich ein Gleichgewicht eingestellt hat. Auf diesen Punkt werden wir noch zurückkommen.

Es war von Interesse zu untersuchen, wie sich die Hemmung bei anderen Chininkonzentrationen verhielt, vor allem, wie sich die Beziehungen zwischen der $H^{\cdot}$-Konzentration und der Hemmungsgröße bei anderen Giftkonzentrationen verhielten.

Die nachfolgenden Versuche sind mit m/15 Chininlösung angestellt.

Versuch 15.

9. Januar 1923. Kultur vom 7. Januar. Zusatz: $12^h 25'$. Beginn: $1^h 01'$. Acetatgemisch 1:7, $p_H = 5,58$.

Zeit	Hemmung Proz.	Gesamtzeit	O_2-Verbrauch in ccm mit Chinin	O_2-Verbrauch in ccm ohne Chinin
$1^h 15'$	66,2	40'	10,54	3,54
1 25	71,2		18,27	5,48
2^h bis 2 30	78,0	2h 5	14,72	3,24
2 50' „ 3	78,0		14,78	3,25

Versuch 16.

12. Januar 1923. Kultur vom 9. Januar. Zusatz: $12^h 35'$. Beginn: $1^h 08'$. Acetatgemisch 1:5, $p_H = 5,4$.

Zeit	Hemmung Proz.	Gesamtzeit	O_2-Verbrauch in ccm ohne Chinin	mit Chinin
$1^h 25'$	61	50'	11,41	4,52
2 08	68,2		23,61	7,43
$2^h 15'$ bis 2 25	67,8	$1^h 50$	8,40	3,75

Versuch 17.

22. Januar 1923. Kultur vom 17. Januar. Zusatz: $4^h 10'$. Beginn: $4^h 50'$. Acetatgemisch 1:11, $p_H = 5,97$.

Zeit	Hemmung Proz.	Gesamtzeit	O_2-Verbrauch in ccm ohne Chinin	mit Chinin
$5^h 05'$	78,6	55'	8,69	1,53
5 17	82		14,83	2,68
$5^h 21'$ bis 5 40	90		9,0	1,1
6 05 „ 6 20	100	$2^h 10$	8,72	0

Bei diesem p_H ist also nach 2 Stunden eine völlige Hemmung der Atmung eingetreten.

Versuch 18.

25. Januar 1923. Kultur vom 23. Januar. Zusatz: $4^h 15'$. Beginn: $5^h 30'$. Acetatgemisch 1:3, $p_H = 5,15$.

Zeit	Hemmung Proz.	Gesamtzeit	O_2-Verbrauch in ccm ohne Chinin	mit Chinin
$5^h 45'$	60	$1^h 30'$	5,6	2,24
6	58,9		10,2	4,14
$6^h 10'$ bis 6 30	60,1	2 15	7,15	2,74

Versuch 18a.

26. Januar 1923. Kultur vom 23. Januar. Acetatgemisch 1:1, $p_H = 4,63$. Endhemmung: 31 Proz. Dieser Versuch wird in einem der folgenden Kapitel noch genau wiedergegeben werden.

Wie die Abb. 12 zeigt, verläuft die Atmungshemmung dieser Reihe parallel zur Hemmung durch m/25 Chininlösung, nur daß — wie es bei der stärkeren Konzentration an Chinin zu erwarten war — die absolute Hemmung stärker ist.

II. Zur Prüfung gesetzmäßiger Beziehungen zwischen Giftkonzentration und Giftwirkung (bei gleichbleibendem p_H) wurden, ausgehend von einer m/25 Lösung von Chinin. hydrochlor., in geometrischer

Reihe Verdünnungen hergestellt und diese den Hefesuspensionen zugefügt. Zunächst wurde die Endhemmung abgewartet, dann in 20 Minuten während des Versuches die verbrauchte Menge Sauerstoff (gleichzeitig mit einer Kontrolle ohne Chinin) festgestellt.

Im folgenden seien einige dieser Versuche wiedergegeben:

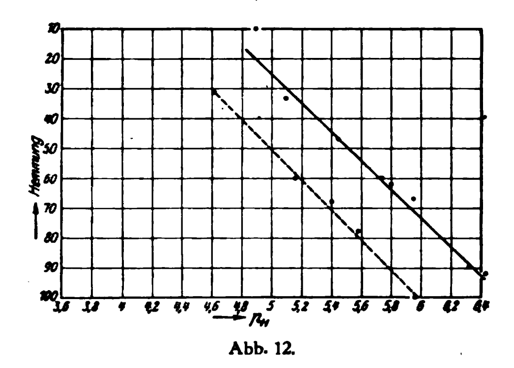


Abb. 12.

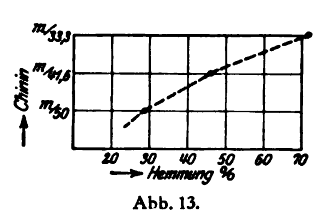


Abb. 13.

Versuch 19 (Abb. 13, 14).

3. November 1922. Kultur vom 1. November. In I kein Chinin; in II 1 ccm m/33,3 Chinin; in III m/41,6 Chinin; in IV m/50 Chinin. Gesamtvolumen 10 ccm. In I 5 ccm Acetatgemisch, p_H = 6,0, 4 ccm Hefesuspension und 1 ccm NaOH 30 Proz. In II bis IV 4 ccm Acetatgemisch, 1 ccm Chinin, sonst wie in I. Zusatz des Chinins zur Hefesuspension 11h. Versuchsbeginn: 2h 22′. Ablesung: 2h 42′.

	I.	II.	III.	IV.
O_2-Verbrauch ccm . . .	10,14	2,88	5,49	7,22
Hemmung in Proz. . . .		71,6	45,9	28,8
Log. der Hemmung . .		1,8549	1,6618	1,4594

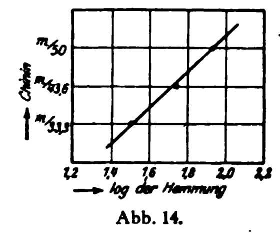


Abb. 14.

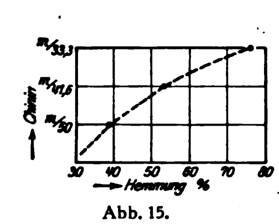


Abb. 15.

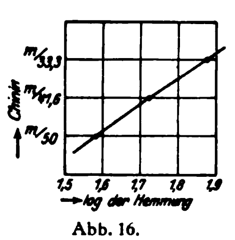


Abb. 16.

Versuch 20 (Abb. 15, 16).

Dieselbe Anordnung wie im vorigen Versuch bei p_H = 6,12. Versuchsdauer 50 Minuten.

	I.	II.	III.	IV.
O_2-Verbrauch ccm . . .	21,08	4,99	9,88	12,91
Hemmung in Proz. . . .		76,3	53,2	38,8
Log. der Hemmung . .		1,8825	1,7259	1,5888

Versuch 21.

6. November 1922. Kultur vom 3. November. In I kein Chinin; in II m/83,4 Chinin; in III m/66,7 Chinin; in IV m/50 Chinin. $p_H = 6,0$. Zusatz: $12^h 03'$. Versuchsbeginn: $2^h 08'$. Ablesung: $2^h 53'$.

	I.	II.	III.	IV.
O_2-Verbrauch ccm . . .	26,33	21,85	20,49	18,80
Hemmung in Proz. . . .		17,1	22,2	28,6
Log. der Hemmung . .		1,2330	1,3464	1,456

Die Versuche und die beigefügten Abbildungen zeigen, daß bei Änderung der Konzentration des Chinins in einer geometrischen Reihe der Logarithmus der Hemmung, graphisch dargestellt, eine gerade Linie ergibt.

III. Um die oben gestreifte Frage zu prüfen, ob auf den zeitlichen Ablauf des Vergiftungsvorganges die Zellmembran eine Rolle spielt, wurde in einer Reihe von Versuchen die Zellmembran vor dem Zusatz des Chinins zur Hefesuspension zerstört. Zu diesem Zwecke wurden die Hefezellen zunächst in eine Kältemischung von etwa — 25° gebracht, dort gefroren und nunmehr in einem Wasserbade von 60° wieder aufgetaut. Diese Prozedur wurde dreimal wiederholt. Wie wir in unserer ersten Mitteilung feststellen konnten, übt eine solche Behandlung in der Regel keinen nennenswerten Einfluß auf die Atmungsgröße aus.

Die Versuche verliefen wie folgt.

Versuch 22 (Abb. 17).

8. Dezember 1922. Kultur vom 4. November. Dreimal vereist und wieder aufgetaut. Acetatgemisch: $p_H = 5,4$. Chinin m/25, Zusatz zur Zellsuspension: 12^h. In I kein Chinin. In II und III je 1 ccm Chininzusatz. Beginn: $12^h 42'$.

Zeit	O_2-Verbrauch in ccm			Hemmung	Gesamtzeit
	I.	II.	III.	Proz.	
$12^h 53'$	10,6	6,21	6,64	39,5	53'
1	16,74	9,73	10,12	40,8	
1 12	27,16	16,35	16,35	39,7	$1^h 12$

Versuch 23 (Abb. 18).

9. November 1922. Kultur vom 6. November. $p_H = 5,2$. In I und II ohne, in III und IV mit m/25 Chinin. Zellen nur einmal vereist und wieder aufgetaut. Zusatz: $12^h 40'$. Beginn: $2^h 11'$.

Zeit	O_2-Verbrauch in ccm				Hemmung	Gesamtzeit
	I.	II.	III.	IV.	Proz.	
$2^h 33$	8,16	7,91	5,59	6,1	27,2	$1^h 37'$
2 45	12,59	12,83	8,1	8,79	33,9	
3 03	19,22	19,71	11,59	12,2	38,7	2 27

Versuch 24 (Abb. 19).

10. November 1922. Kultur vom 8. November. $p_H = 6,05$. In II und III Chinin m/25, Suspension dreimal vereist und aufgetaut. Zusatz: $1^h 40'$. Beginn: $2^h 02'$.

Zeit	O_2-Verbrauch in ccm			Hemmung	Gesamtzeit
	I.	II.	III.	Proz.	
$2^h 20'$	18,28	3,83	3,65	79,5	40'
2 28	24,80	4,97	4,81	81,8	
2 38	33,31	6,73	6,47	80,2	58

Abb. 17.

Abb. 18.

Abb. 19.

Versuch 25.

9. Dezember 1922. Kultur vom 6. Dezember. Zellsuspension dreimal vereist und wieder aufgetaut. Zusatz: $12^h 15'$. Beginn: $1^h 02'$. In I bis III Chinin. In IV und V kein Chinin.

Verbrauchte Menge O_2 in ccm					Während einer Zeit von	Hemmung	Gesamtzeit
I.	II.	III.	IV.	V.		Proz.	
13,80	14,14	14,23	16,56	16,92	15 Min.	18,6	$1^h 02'$
12,28	12,12	12,69	14,49	14,61	12 „	17,7	
?	18,17	18,04	21,94	22,24	18 „	18,6	1 30'

Die Versuche zeigen einmal, daß die Größenordnung der Atmungshemmung durchaus derjenigen bei intakten Zellen entspricht, ferner die Hemmung hier nicht progressiv verläuft, sondern bald nach Versuchsbeginn ihren Endwert erreicht. (Im Versuche 23 mit nur einmaliger Vereisung wurde offenbar eine ausgiebige Zerstörung der Zellmembran noch nicht erreicht.) Diese Tatsache spricht sehr zugunsten der Auf-

fassung, daß der progressive Verlauf der Vergiftung auf eine mehr oder weniger langsame Durchgängigkeit der Zellmembran für das Gift zurückzuführen ist.

IV. Bei den bisher wiedergegebenen Versuchen konnten wir eine Atmungsförderung durch das Chinin nie feststellen. Auch als Vorläufer einer später einsetzenden Hemmung trat eine Förderung, wie sie *Rona* und *Bloch*[1]) an Gänseerythrocyten beobachtet hatten, nicht auf, und da, wo es sich erwies, daß die Konzentration der Chininlösung nicht ausreichte, um eine Vergiftung hervorzurufen, war überhaupt keine Wirkung vorhanden.

Hierzu ist nun zu bemerken, daß alle diese Versuche des vorigen Abschnittes innerhalb *des* Reaktionsbereiches angestellt wurden, den wir als Optimum für die Atmung unserer Hefezellen experimentell erkannt hatten. Als wir nunmehr einen Versuch — in anderem Zusammenhang — ansetzten, der außerhalb dieses Optimums im sauren Gebiete lag, erhielten wir eine Förderung, und zwar bei einer Giftkonzentration, die bisher stets eine deutliche Hemmung gezeitigt hatte.

Diese Erscheinung regte uns dazu an, die so gefundene Förderung bei derselben Chininkonzentration — es handelte sich um eine m/25 Lösung — und verschiedenem p_H eingehender zu untersuchen.

Die Versuchsanordnung wurde nicht abgeändert, sondern lediglich die Acetat-Puffergemische durch Übergewicht an Essigsäure auf ein niedriges p_H gebracht.

Versuch 26.

17. November 1922. Kultur vom 14. November. Zusatz der Zellsuspension zur Chininlösung: 12h 18′. p_H = 3,98. In Manometer I 1 ccm m/25 Chinin. hydrochlor. In II und III Kontrollen ohne Chinin. Gesamtmenge wie immer 10 ccm. Beginn: 12h 28′.

Zeit	O_2-Verbrauch in ccm			Förderung
	I.	II.	III.	Proz.
12h 43	2,98	1,66	1,33	44,4
1	4,19	2,35	2,32	44

Versuch 27 (Abb. 20).

21. November 1922. Kultur vom 18. November. Zusatz: 12h. In I und II Chinin. III und IV Kontrollen. p_H = 3,91. Beginn: 12h 46′.

Zeit	O_2-Verbrauch in ccm				Förderung
	I.	II.	III.	IV.	Proz.
1h 01′	4,20	3,65	2,15	2,31	43,8
1 11	6,8	5,92	3,32	3,54	46,3
1 22	9,28	8,18	4,48	4,92	46,2
1 36	12,82	10,0	6,05	6,46	45,0
1 46	15,24	13,57	7,41	7,70	47,6

[1]) Diese Zeitschr. 128, 169, 1922.

Versuch 28. 24. November 1922. Kultur vom 20. November. Zusatz: 12^h. In I Chinin. $p_H = 3{,}93$. Beginn: $12^h 42'$.

Zeit	O_2-Verbrauch in ccm			Förderung
	I.	II.	III.	Proz.
1^h	3,03	2,07	1,83	35,7
1 15′	4,78	2,89	2,66	41,2
1 30	6,76	3,73	3,65	45,4
1 47	8,85	4,55	4,65	48,1

Versuch 29 (Abb. 21).

27. November 1922. Kultur vom 24. November. Zusatz: $11^h 40'$. In I und II Chinin. $p_H = 4{,}0$. Beginn: $12^h 21'$.

Zeit	O_2-Verbrauch in ccm				Förderung
	I.	II.	III.	IV.	Proz.
$12^h 41'$	3,26	2,98	2,07	1,91	39
12 53	5,35	4,93	3,21	2,99	37,7
1 01	6,76	6,23	3,93	3,65	40,3
1 11	8,15	7,63	4,70	4,32	40,8

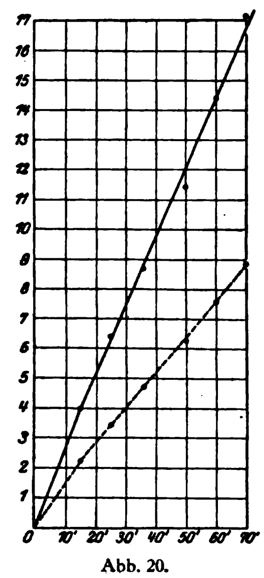


Abb. 20.

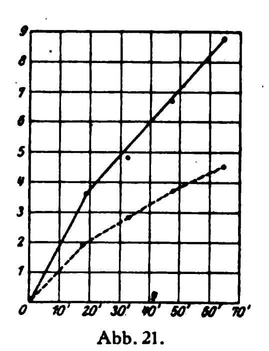


Abb. 21.

Versuch 30. 28. November 1922. Kultur vom 24. November. Zusatz: $12^h 10'$. In I und II Chinin. $p_H = 4{,}24$. Beginn: $12^h 41'$.

Zeit	O_2-Verbrauch in ccm				Förderung
	I.	II.	III.	IV.	Proz.
$1^h 01'$	4,6	5,08	3,52	3,15	20,8
1 11	6,81	7,16	5,18	4,48	36,1
1 21	8,83	9,0	6,21	5,48	34,8

Versuch 31.

30. November 1922. Kultur vom 27. November. In I, II und III Chinin. p_H = 4,6. Zusatz: 11h30′. Beginn: 12h24′.

Zeit	O_2-Verbrauch in ccm					Förderung
	I.	II.	III.	IV.	V.	Proz.
12h 34′	3,50	3,15	3,35	2,59	2,82	18,9
12 44	6,81	6,52	6,53	5,38	5,48	17,9
12 54	10,39	9,79	9,67	8,28	8,38	16,2
1 05	13,80	12,81	12,65	10,97	11,04	15,9
1 14	17,11	15,85	15,44	13,66	13,61	15,5
1 24	19,78	18,64	18,04	16,15	15,80	15,1
1 35	22,54	21,55	20,85	18,73	18,68	13,6
1 46	27,04	24,93	23,81	21,74	21,75	13,9

Versuch 32.

1. Dezember 1922. Kultur vom 28. November. In I, II und III Chinin p_H = 4,79. Zusatz: 11h40′. Beginn: 12h17′.

Zeit	O_2-Verbrauch in ccm					Förderung
	I.	II.	III.	IV.	V.	Proz.
12h 27′	3,86	3,73	3,90	3,31	3,48	12,3
12 37	8,46	8,16	8,09	7,14	7,30	12,4
12 47	12,69	12,12	12,00	10,76	11,04	11,2
12 57	17,29	15,96	15,81	14,28	14,60	11,7
1 07	20,70	19,22	18,97	17,28	17,76	10,8
1 17	24,8	22,88	22,88	20,74	21,33	11,8

Ebenso wie bei der Hemmung ist also auch der Endwert der Förderung von der H-Ionenkonzentration abhängig; nur daß hier die Wirkung um so größer ist, je weiter wir in das saure Gebiet vordringen, während umgekehrt die Hemmung mit der Zunahme an Alkalität wächst. Die Förderung ist somit scheinbar eine geradlinige Fortsetzung der Hemmung.

Als weiteren Unterschied zu den Erscheinungen der Hemmung finden wir hier eine augenblickliche Einstellung der endgültigen Förderung und keine Progression. Das Fortschreiten der Förderung in Versuch 28 ist nur scheinbar; in Wirklichkeit nimmt nur die Atmung der Kontrollen ohne Chinin ab, so daß der Eindruck einer Progression erweckt wird. Daß eine solche Abnahme der Atmung ohne jeglichen Zusatz bei saurer Reaktion eintritt, haben wir bereits in unserer ersten Mitteilung zeigen können.

Andererseits konnten wir aber — wenigstens bei dieser Giftkonzentration — einen Übergang von Förderung in Hemmung nicht feststellen. Einmal, in Versuch 31, fand zwar eine geringe Abnahme

der Atmung mit der Zeit statt, ohne aber während der Versuchsdauer in Hemmung überzugehen. Ob tatsächlich schließlich doch eine Hemmung eingetreten wäre, läßt sich nicht sagen, da die Atmung bei saurer Reaktion nach einer bestimmten Zeit überhaupt aufhört, so daß die angesetzten Kontrollen zum Vergleich nicht herangezogen werden können. Wir haben uns aber davon überzeugt, daß die Atmung der Zellen in saurer Lösung länger anhält, wenn Chinin hinzugefügt wird. Jedenfalls geht bei Zusatz von m/25 Chinin. hydrochlor. während der (aus diesem Grunde) möglichen Versuchsdauer die Förderung nicht in Hemmung über, sondern die Förderung erreicht in fast allen Fällen mit nicht meßbarer Geschwindigkeit ihren Endwert und bleibt konstant.

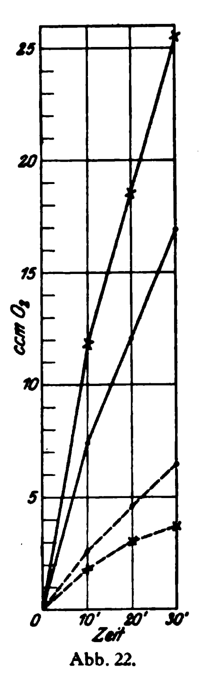


Abb. 22.

Bei der Beurteilung der hier obwaltenden Verhältnisse mußte jedoch daran gedacht werden, daß es sich hier gar nicht um eine wirkliche Förderung der Atmung handelt, sondern diese nur dadurch zustande kommt, daß lediglich nicht ein so hoher Grad von Hemmung auftrat, wie er bei bestimmtem p_H in saurem Gebiete unter normalen Bedingungen gefunden wurde.

Um dies zu entscheiden, mußte die Atmungsgröße unter optimalen Bedingungen verglichen werden: erstens mit der Atmungsgröße bei einer H'-Ionenkonzentration, die außerhalb des Optimums lag, und zweitens mit der Atmungsgröße bei dieser H'-Ionenkonzentration unter Zusatz von Chinin. In den folgenden Versuchen seien die Ergebnisse wiedergegeben.

Versuch 33 (Abb. 22).

5. Dezember 1922. Kultur vom 30. November. In I Chinin m/25. In II Kontrolle ohne Chinin. $p_H = 4{,}0$. In III Chinin m/25. In IV, V Kontrolle ohne Chinin. $p_H = 5{,}44$. Zusatz des Chinins zur Hefe: 12h 30'. Beginn: 1h'.

Zeit	O_2-Verbrauch in ccm				
	I.	II.	III.	IV.	V.
1h 15'	2,58	1,86	7,44	11,59	12,1
1 25	4,60	3,03	12,09	18,21	18,7
1 35	6,44	3,73	16,93	25,46	25,6

● — — — mit } Chinin außerhalb des optimalen Bereiches,
× — — — ohne }
● ——— mit } Chinin innerhalb des Optimums.
× ——— ohne }

Versuch 34 (Abb. 23). 6. Dezember 1922. Kultur vom 4. Dezember. In I Kontrolle; in II Chinin; $p_H = 4{,}42$. In III und IV Kontrolle; in V Chinin; $p_H = 5{,}15$. Zusatz: 11h 50′. Beginn: 12h 18′.

Zeit	O_2-Verbrauch in ccm				
	I.	II.	III.	IV.	V.
12h 30′	2,58	3,50	6,51	6,81	6,6
12 55	8,46	10,25	19,72	20,7	17,43
1 06	10,58	12,35	25,60	25,40	21,58

Diese beiden Versuche, die als Beispiel angeführt seien, beantworten die oben gestellte Frage in unzweideutiger Weise. Wir erkennen besonders aus den beiden Abb. 22 und 23 deutlich, daß die Atmung dort am größten ist, wo die Zellen sich unter physiologischen Bedingungen innerhalb der Reaktionsbreite befinden, die als Optimum für die gewöhnliche Atmung erkannt wurde. Die Förderung der Atmung durch Chinin im sauren Gebiete, das außerhalb dieses Optimums liegt, reicht nicht nur nicht an diese Atmungsgröße heran, sondern bleibt selbst noch hinter der Hemmung zurück, welche durch dieselbe Chininkonzentration innerhalb des optimalen Gebietes erzielt wird.

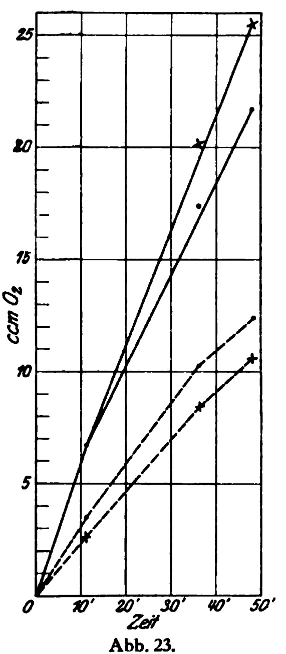


Abb. 23.

Es handelt sich hier also nicht um eine echte, „absolute“ Förderung, sondern um eine relative. Wir möchten sogar annehmen, daß es sich dabei überhaupt nicht um einen Vorgang handelt, der als aktive Förderung anzusehen ist, sondern es liegt nahe, daran zu denken, daß das Chininsalz in einer derartigen sauren Lösung die Zellmembran für die H-Ionen undurchlässig macht und so lediglich die hemmende Wirkung der Wasserstoffionen abschwächt.

Wie aber auch die Deutung des Befundes ist, die Tatsache ist zweifellos für manche biologischen und pharmakologischen Fragen von Bedeutung. Es liegt hier eine bisher nicht beobachtete Art von fördernder Wirkung eines Giftes vor, die nichts mit der Förderung durch ganz kleine Giftkonzentrationen — wie dies in dem *Arndt-Schultze*schen Gesetze zum Ausdruck kommt — zu tun hat.

Während wir durch Zusatz von m/25 Chinin nie einen Übergang von „Förderung“ in Hemmung erzielten, konnten wir ein derartiges Verhalten nachweisen, als wir vergleichende Untersuchungen mit einer m/15 Chininlösung anstellten.

Versuch 35 (Abb. 24).

26. Januar 1923. Kultur vom 23. Januar. In I und II Kontrollen; in III und IV Chinin; $p_H = 3{,}93$. Zusatz: $4^h 15'$. Beginn: $4^h 50'$. (Gesamtmenge wie immer 10 ccm. Je 1 ccm Chinin in III und IV.)

Zeit	Förderung Proz.	Hemmung Proz.
5h	23	—
5 15′	21	—
5 30	9	—
5 45	0	0
6	—	10,5
6 15	—	16
6 30	—	21
6 45	—	21

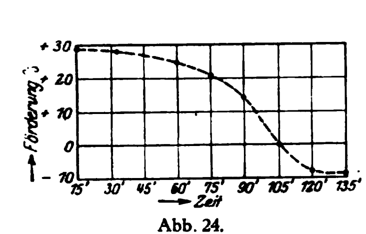


Abb. 24.

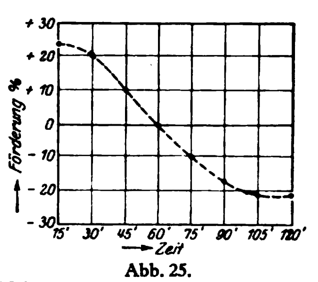


Abb. 25.

Versuch 36 (Abb. 25).

29. Januar 1923. Kultur vom 26. Januar. Anordnung wie oben, bei $p_H = 4{,}4$. Zusatz: $5^h 45'$. Beginn: $6^h 12'$.

Zeit	Förderung Proz.	Hemmung Proz.
6h 25′	28,5	—
6 42	28,0	—
7	25,4	—
7 15	20,0	—
7 30	15,0	—
7 45	0	0
7 55	—	8
8 05	—	8

V. Es lag uns nun ob zu untersuchen, ob außer dieser „relativen Förderung“ auch eine echte, durch ganz kleine Giftkonzentrationen bewirkte zu beobachten wäre. Es mußte entschieden werden, ob für unsere Hefe innerhalb des optimalen Reaktionsbereiches durch kleine, nicht mehr hemmend wirkende Giftkonzentrationen die Atmungsgröße über das Optimum hinaus gesteigert werden kann.

Wir haben oben zeigen können, daß bei Konzentrationen, die nicht mehr hemmend wirkten (z. B. m/100 Chinin), überhaupt keine Wirkung zu bemerken war. Es mußte das aber jetzt bei der speziellen Fragestellung noch genauer untersucht werden.

Versuch 37. 8. Februar 1923. Kultur vom 6. Februar. Chinin m/75. Zusatz: $4^h 10'$. p_H in I bis IV = 5,29; p_H in V und VI = 7,02. Chinin in III, IV und VI. Beginn: $4^h 45'$.

Zeit	O_2-Verbrauch in ccm						Förderung	
	I.	II.	III.	IV.	V.	VI.	p_H 5,29 Proz.	p_H 7,02 Proz.
5^h 05′	8,39	8,73	10,46	10,81	16,0	16,4	19,5	0
5 15	13,49	13,60	16,66	16,76	—	—	19,0	—
5 25	18,16	18,31	22,08	21,99	12,8	13,0	17,1	0
5 35	22,83	23,01	28,06	22,63	21,09	21,2	17,7	0

Es besteht hier innerhalb des früher als optimal gefundenen Bereiches (p_H 5,29) durch m/75 eine Förderung. Merkwürdigerweise ist bei p_H 7,02 auch ohne Zusatz von Chinin die Atmung größer als bei p_H 5,29, was unseren bisherigen Versuchen widerspricht, da dieses p_H bereits außerhalb des Optimums liegt. Es sei gleich hier erwähnt, daß etwa 10 Tage vor Ansetzen dieses Versuches aus äußeren Gründen mit den Kulturen nicht gearbeitet worden war.

Versuch 38.

9. Februar 1923. Kultur vom 6. Februar. m/75 Chinin in III und IV. p_H = 5,5. Zusatz: $5^h 30'$. Beginn: $5^h 50'$.

Zeit	O_2-Verbrauch in ccm				Förderung Proz.	
	I.	II.	III.	IV.		
6^h	4,23	4,36	5,06	4,88	17,7	
6 13′	9,82	10,08	11,04	11,09	10	
6 20	14,01	14,44	15,76	15,60	9,3	
6 35	6,48	6,38	7,36	7,33	12,5	Neu angesetzt, nach 14 Min.

Versuch 39.

13. Februar 1923. Kultur vom 10. Februar. m/75 Chinin in III, IV und VI. p_H in I bis IV = 5,4. p_H in V und VI = 5,5. Zusatz: $4^h 10'$. Beginn: $4^h 50'$.

Zeit	O_2-Verbrauch in ccm						Förderung	
	I.	II.	III.	IV.	V.	VI.	p_H 5,4 Proz.	p_H 5,5 Proz.
5^h	5,36	5,46	6,21	6,76	7,36	8,64	16,3	14,8
5 12′	10,2	10,4	11,95	12,4	13,92	15,68	14	11,2
5 21	13,56	13,8	16,1	16,4	19,36	21,6	21	10,6

Versuch 40.

14. Februar 1923. Kultur vom 10. Februar. m/75 Chinin in I, II und VI. p_H in I bis IV = 5,6. p_H in V und VI = 5,51. Zusatz: 4^h. Beginn: $4^h 22'$.

	Zeit	O_2-Verbrauch in ccm						Förderung	
		I.	II.	III.	IV.	V.	VI.	p_H 5,6 Proz.	p_H 5,51 Proz.
	5^h	24,56	25,1	21,5	22,0	22,72	24,64	12,6	10,0
Neu angesetzt	6 15′	15,74	16,16	14,44	13,8	14,56	16,32	8,1	12,4
	6 25	25,43	26,1	23,5	23,0	23,36	28,0	7,4	11,9

Versuche mit m/100 Chinin.

Versuch 41.

16. Februar 1923. Kultur vom 13. Februar. Chinin in III und IV. $p_H = 5,64$.
Zusatz: 4^h^. Beginn: 6^h^.

	Zeit	O_2-Verbrauch in ccm				Förderung
		I.	II.	III.	IV.	Proz.
	6h12′	10,03	10,12	12,03	12,48	16,4
	6 25	19,54	19,32	22,2	22,88	13,8
Neu angesetzt	6 50	3,80	3,91	4,7	4,8	16,9

Versuch 42.

17. Februar 1923. Kultur vom 15. Februar. Chinin in III und IV. $p_H = 6,35$.
Zusatz: $3^h\,20'$. Beginn: $3^h\,40'$.

	Zeit	O_2-Verbrauch in ccm				Förderung
		I.	II.	III.	IV.	Proz.
	3h50′	6,6	6,46	7,7	7,84	16,3
	4 05	14,53	14,49	16,92	17,12	16,2
Neu angesetzt, nach 15 Min.	6 45	10,55	10,35	12,03	12,34	16,4

Versuch 43.

18. Februar 1923. Kultur vom 15. Februar. Chinin in III und IV. $p_H = 5,28$.
Zusatz: $3^h\,40'$. Beginn: 4^h.

	Zeit	O_2-Verbrauch in ccm				Förderung
		I.	II.	III.	IV.	Proz.
	4h35′	6,92	6,89	8,28	8,64	18,6
	4 48	12,80	12,92	15,87	16,16	19,7
	5	16,43	16,56	20,81	21,24	21,6
Neu angesetzt, nach 20 Min.	5 32	6,74	7,07	10,12	10,34	32,4
	5 50	12,80	13,1.	18,63	19,36	31,5
	6 05	17,99	18,18	25,99	26,8	32,1

Die eben angeführten Versuchsergebnisse stehen in einem scheinbaren Widerspruch mit den bisher gefundenen. Zunächst fällt auf, daß überhaupt durch m/75 und m/100 Chininlösungen eine Förderung erreicht wird, während wir früher sahen, daß diese Konzentrationen keinerlei Einfluß auf die Atmung besaßen. Dieser Umstand war um so auffälliger, als wir uns jetzt in einem Gebiete bewegten, welches wir früher als das Optimum erkannt hatten. Demnach mußte es sich hier also um eine absolute Förderung handeln. Was aber trotzdem die absolute Natur der Förderung in Zweifel ziehen läßt, ist die Tatsache, daß innerhalb des bisherigen Optimums auch bei den ohne Chinin angesetzten Kontrollen die Atmungsgröße mit verändertem p_H sich änderte. Ein solches Verhalten haben wir vordem nie feststellen

können, und es lag so die Vermutung nahe, *daß sich das Optimum des p_H für die Atmung der Hefezellen verändert hatte.*

Wir versuchten nunmehr, dieses Optimum festzustellen. Während der folgenden Tage aber war es unmöglich, irgendwelche Resultate zu erzielen, da die Zellen derart unregelmäßig atmeten, daß sie keinerlei brauchbare Ergebnisse aufwiesen. Obgleich mit der gleichen Methodik wie bisher gearbeitet wurde, schwankten die verbrauchten Mengen Sauerstoff in den einzelnen Manometern ständig. Dabei war kulturell eine Veränderung der Hefe nicht zu konstatieren. Dagegen bemerkten wir in dieser Zeit eine Abnahme des typischen Geruchs der Kulturen. Jedenfalls bleibt es unentschieden, ob wir es mit irgendwelchen Mutationen oder lediglich mit einer Alterserscheinung der Zellen zu tun hatten.

Nach 8 Tagen erhielten wir dann wieder gleichmäßige Resultate und setzten unsere Untersuchungen fort. Da wir gesehen hatten, daß das Optimum nach der alkalischen Seite sich verschoben hatte, so pufferten wir auf ein größeres p_H als bisher.

Versuch 44.

7. März 1923. Kultur vom 4. März. Acetat-Puffergemisch 1:25 $p_H = 6{,}98$. Zusatz: 3h. Beginn: 3h 10'. m/100 Chinin in I und II.

Zeit	O_2-Verbrauch in ccm			
	I.	II.	III.	IV.
3h 30'	3,11	3,23	3,3	3,38
4 10	9,86	10,10	9,96	9,66
4 50	15,05	14,74	15,03	14,82

Versuch 45.

8. März 1923. Kultur vom 5. März. $p_H = 7{,}03$. m/200 Chinin in I und II. Zusatz: 3h 20'. Beginn: 3h 50'.

Zeit	O_2-Verbrauch in ccm			
	I.	II.	III.	IV.
4h	7,95	8,28	7,82	7,95
4 05'	12,97	13,07	13,3	13,03

Versuch 46.

21. März 1923. Kultur vom 10. März. m/400 Chinin in I. Zusatz: 4h 10'. Beginn: 4h 30'.

Zeit	O_2-Verbrauch in ccm	
	I.	II.
4h 43'	6,64	6,95
4 53	12,62	12,97

Versuch 47. 22. März 1923. Kultur vom 19. März. m/750 Chinin in I und II. p_H = 6,95. Zusatz: 4^h. Beginn: $4^h 50'$.

Zeit	O_2-Verbrauch in ccm			
	I.	II.	III.	IV.
$5^h 06'$	2,19	2,08	2,01	2,12
6 10	10,79	10,48	10,17	10,62

Versuch 48. 23. März 1923. Kultur vom 20. März. m/1500 Chinin in I und II. p_H = 7,0. Zusatz: $4^h 20'$. Beginn: $4^h 45'$.

Zeit	O_2-Verbrauch in ccm			
	I.	II.	III.	IV.
$5^h 15'$	4,20	4,15	4,58	4,13

Diese Versuche zeigen wiederum im Einklang mit den zuerst wiedergegebenen Ergebnissen, daß innerhalb des Optimums eine Förderung durch kleine Chininkonzentrationen nicht zu erzielen ist. Dasselbe zeigt sich auch bei den folgenden Versuchen, an welchen auch durch zum Vergleich angesetzte Kontrollen von verschiedenem p_H die Verschiebung des Optimums zu beobachten ist.

Versuch 49.

27. Februar 1923. Kultur vom 23. Februar. Chinin m/100. Zusatz: $4^h 50'$. II, IV und VI Kontrollen ohne Chinin. In I und II p_H = 5,22. In III und IV p_H = 5,41. In V und VI p_H = 5,6. Beginn: $5^h 35'$.

Zeit	O_2-Verbrauch in ccm					
	I.	II.	III.	IV.	V.	VI.
$5^h 50'$	4,57	4,04	6,67	6,39	8,96	8,32
6	9,68	7,87	13,34	12,22	16,96	15,52
6 15	12,80	10,10	17,48	15,60	22,08	19,84

Wir erkennen hier deutlich, wie mit zunehmendem p_H auch die Atmungsgröße steigt; andererseits ist auch hier die scheinbare Förderung zu verzeichnen, die aber nie an die Atmungsgröße der Kontrolle bei nächsthöherem p_H heranreicht. Dasselbe Bild veranschaulicht der

Versuch 50.

2. März 1923. Kultur vom 28. Februar. Chinin m/100. Zusatz: $4^h 10'$. In II, III und VI Kontrollen ohne Chinin. In I und II p_H = 5,93. In III und IV p_H = 6,29. In V und VI p_H = 6,59. Beginn: $4^h 30'$.

Zeit	O_2-Verbrauch in ccm					
	I.	II.	III.	IV.	V.	VI.
$4^h 36'$	5,25	5,01	5,52	5,64	6,27	5,70
4 44	13,32	12,92	12,88	18,91	15,78	18,84
4 54	20,58	20,19	20,70	22,18	25,75	24,53
5	26,12	25,44	25,76	27,44	31,38	29,19

Versuch 51.

5. März 1923. Kultur vom 2. März. Chinin m/100. Zusatz: $2^h 30'$. In II, IV und VI Kontrollen ohne Chinin. In I und II $p_H = 6{,}45$. In III und IV $p_H = 6{,}8$. In V und VI $p_H = 7$. Beginn: 3^h.

Zeit	O_2-Verbrauch in ccm					
	I.	II.	III.	IV.	V.	VI.
3^h bis $3^h 10'$	15,8	15,1	16,56	16,92	16,87	17,11
3 22′ „ 3 30	13,32	12,51	14,7	14,3	14,32	14,5
3 43 „ 3 50	14,18	13,5	15,71	15,41	15,61	16,1
3 55 „ 4 02	24,39	23,8	26,57	26,50	26,56	26,56

In diesem Versuche stimmen die Werte bei p_H 6,8 und p_H 7,0 überein. Wir befinden uns im Gebiete des Optimums, in welchem eine Förderung durch m/100 Chinin nicht statthat. Das wird auch durch den folgenden Versuch bewiesen. Dagegen befinden wir uns bei p_H 6,45 in Übereinstimmung mit dem vorigen Versuche noch nicht im Optimum; hier sehen wir bei Zusatz von Chinin auch wieder einen stärkeren O_2-Verbrauch gegenüber der Kontrolle.

Versuch 52.

6. März 1923. Kultur vom 2. März. Chinin m/100 in I, III und V. Zusatz: $1^h 45'$. $p_H = 6{,}9$ in I und II. $p_H = 7{,}1$ in III und IV. $p_H = 7{,}3$ in V und VI. Beginn: 2^h.

Zeit	O_2-Verbrauch in ccm					
	I.	II.	II.	IV.	V.	VI.
2^h bis $2^h 25'$	16,6	17,1	16,79	16,54	16,76	16,8
2 45′ „ 3	10,55	10,5	10,58	10,52	10,54	10,42
3 30 „ 3 40	9,6	10	9,9	10,0	9,93	10,1

Da wir bei unseren Versuchen die Beobachtung gemacht hatten, daß sich bei den nun bereits über ein Jahr fortgeführten Hefekulturen das Optimum für die Atmung verschoben hatte, ohne daß kulturell eine wesentliche Änderung zu bemerken war, haben wir dann noch Versuche mit der Stammkultur angestellt. Auch hier hatte eine Verschiebung des Optimums nach der alkalischen Seite stattgefunden, und zwar in demselben Maße, wie bei den fortgeführten Kulturen. Wie weit das Optimum reichte, haben wir nicht festgestellt. Es lag um p_H 7 herum. Die Wirkung des Chinins auf diese Zellen war dieselbe, die wir oben beschrieben haben.

Zusammenfassung.

Im Anschluß an unsere erste Mitteilung, die den Einfluß physiologischer Faktoren auf die Atmung lebender Hefezellen (Torula pulcherrima) zum Gegenstand hatte, wurde nunmehr die Giftwirkung von Chinin. hydrochlor. auf die Zellatmung untersucht.

Es ergab sich dabei, daß in dem für die Atmung der Hefezellen optimalen Reaktionsgebiet 1 ccm einer m/50 Lösung von Chinin. hydrochlor. in 9 ccm Gesamtvolumen des Gemisches bereits eine deutliche Hemmung der Atmung hervorruft.

Die Größe dieser Hemmung ist im hohen Maße von der Wasserstoffionenkonzentration des Mediums abhängig, und zwar nimmt sie bei gleicher Konzentration des Giftes mit steigendem p_H zu, was dafür spricht, daß die Hemmung durch Chininbase bewirkt wird. Die Vergiftung verläuft zeitlich progressiv, um schließlich für jedes p_H ein bestimmtes Maximum zu erreichen. Dieser Endwert der Hemmung wurde unter den gegebenen Versuchsbedingungen bei einer m/25 Chininlösung etwa 2 Stunden nach dem Zusatz des Chinins zur Hefesuspension erreicht.

Läßt man unter denselben Bedingungen Chinin auf vorher durch Vereisen und wieder Auftauen zerstörte Hefezellen wirken, so ist der Endwert der Hemmung der gleiche wie bei intakten Zellen. Dagegen verläuft hier die Hemmung nicht progressiv, sondern erreicht die entsprechende Höhe gleich. Die Progressivität der Hemmung scheint demnach mit der Permeabilität der Zellmembran im Zusammenhang zu stehen.

Chininkonzentration und die (absolute) Hemmung (bei gleichbleibendem p_H) stehen in gesetzmäßiger Beziehung zueinander: die Logarithmen der Hemmungen liegen bei Änderung der Giftkonzentration nach einer geometrischen Reihe auf einer Geraden. — Die Hemmungslinien der verschiedenen Chininkonzentrationen verlaufen bei verschiedenem p_H parallel zueinander.

Verändert man die Wasserstoffionenkonzentration des Mediums, daß diese außerhalb des optimalen Reaktionsbereiches nach der sauren Seite hin verschoben wird, so tritt statt der Hemmung bei gleicher Giftkonzentration eine Förderung auf; diese nimmt mit fallendem p_H zu. Ihr Endwert stellt sich im Gegensatz zur Hemmung sofort ein.

Zur Lösung der Frage, ob es sich hier um eine echte Förderung handelt, wurde die Atmungsgröße bei Zusatz von Chinin außerhalb des Optimums verglichen mit Kontrollen ohne Chininzusatz, die sich im optimalen Reaktionsbereich befanden. Es zeigte sich, daß die Atmung dort am größten ist, wo die Zellen sich unter physiologischen Bedingungen innerhalb der optimalen Reaktionsbreite befanden, und die scheinbare Förderung gegenüber der Kontrolle in saurem Gebiete nicht nur nicht an diese Atmungsgröße heranreicht, sondern zum Teil noch hinter der Hemmung zurückbleibt, die durch dieselbe Chininkonzentration innerhalb des optimalen Gebietes erreicht wird.

Es handelt sich hier also keineswegs um eine echte Förderung der Atmung. Wahrscheinlich handelt es sich hier überhaupt nicht

um einen Vorgang, der als aktive Förderung aufzufassen ist, sondern es liegt nahe, daran zu denken, daß das Chininsalz in einer derartigen sauren Lösung die Zellmembran für die H-Ionen undurchlässig macht und so lediglich die hemmende Wirkung der Wasserstoffionen abschwächt.

Während wir durch Zusatz von m/25 Chininlösung einen Übergang von „Förderung" in Hemmung im Verlaufe der Giftwirkung nie erzielten, konnten wir ein derartiges Verhalten bei m/15 Chininlösung beobachten.

Eine echte, absolute Förderung über die Atmungsgröße des Optimums hinaus wurde nie, auch durch noch so niedrige Chininkonzentrationen, erreicht, dagegen kann eine scheinbare Förderung außerhalb des Optimums noch durch Konzentrationen, die nicht mehr hemmen, hervorgerufen werden.

Nachdem wir etwa 1 Jahr lang mit denselben, stets gleichmäßig fortgeführten Kulturen unserer Heferasse gearbeitet hatten, zeigten sich plötzlich Unregelmäßigkeiten in der Atmung, die ein Arbeiten mit den Kulturen unmöglich machten. Danach zeigte es sich, daß das Optimum für die Atmung sich verändert hatte und nach dem alkalischen Gebiete zu (um p_H 7) gewandert war. Kulturell und mikroskopisch war eine Veränderung der Zellen nicht zu bemerken.

Untersuchungen über Autolyse. I.

Von

P. Rona und **E. Mislowitzer.**

(Aus der chemischen Abteilung des pathologischen Instituts der Universität; Charité Berlin.)

(Eingegangen am 21. Juni 1923.)

Mit 22 Abbildungen im Text.

I. Obgleich die entscheidende Rolle der Reaktion des Mediums auf die Autolyse schon frühzeitig erkannt worden ist, haben erst neuere Arbeiten, vor allem die von *Dernby*, ferner die von *Bradley*[1]) den Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration auf den autolytischen Prozeß eingehender studiert.

Bei unseren Untersuchungen, deren Ziel ist, den Vorgang der Autolyse nach verschiedenen Richtungen hin durchzuarbeiten, war unsere erste Aufgabe, diesen wichtigen Faktor zu prüfen und ihn mit anderen Faktoren, die die Autolyse beeinflussen, zu kombinieren. Benutzt wurden in der vorliegenden Arbeit stets Lebern von Meerschweinchen, die in folgender Weise verarbeitet worden sind.

Die dem leicht narkotisierten Tier steril entnommenen Leberstücke werden in steriles Stanniolblatt gewickelt und dann in eine bereits vorbereitete Kältemischung getan. Während die Leber gefriert, werden die Pufferlösungen aufgekocht und die einzelnen für die $H^{\cdot}$-Reihe nötigen Mischungen in sterile Erlenmeyerkölbchen von etwa 50 ccm Inhalt getan. Die völlig durchgefrorene Leber wird in kleine Stücke geschnitten und dann durch einen sterilisierten Latapie gedreht. Der Leberbrei wird in einem sterilisierten Erlenmeyerkolben von etwa 150 ccm aufgefangen; durch Zufügen von sterilem Wasser und gutes Schütteln wird dann eine gleichmäßige Suspension hergestellt, von der in jedes der obigen Kölbchen eine bestimmte Menge einpipettiert wird. Zum Schluß kommen noch wenige Tropfen Toluol in jedes Kölbchen, die dann in den Brutschrank gestellt werden. Aus diesen Kölbchen werden in bestimmten Zeitabschnitten 2 oder 4 ccm

---

[1]) Bezüglich der Literatur vgl. *H. C. Bradley*, Autolysis and atrophy in Physiological Reviews **2**, 415, 1922; *R. G. Dernby*, diese Zeitschr. **81**, 109, 1917; Journ. of biol. Chem. **35**, 179, 1918; *H. C. Bradley*, Journ. of. biol. Chem. **50**, 14, 1922; *A. Koehler*, *E. Severinghaus* und *H. C. Bradley*, ebendaselbst S. 15; *H. C. Bradley*, ebendaselbst **52**, 467, 1922.

entnommen, in ein Becherglas mit 20 ccm destilliertem Wasser getan, gegen Neutralrot neutralisiert, dann kurz aufgekocht. Nach erfolgter Koagulation werden 5 ccm einer zehnfach verdünnten kolloidalen Eisenhydroxydlösung unter starker Bewegung der Flüssigkeit allmählich zugegeben und mit wenigen Tropfen einer gesättigten Lösung von Kaliumsulfat ausgeflockt. Der Inhalt des Becherglases wird dann quantitativ unter Nachspülen mit destilliertem Wasser in einen Meßzylinder gespült und auf ein bestimmtes Volumen gebracht. Nach einigem Stehen wird durch ein trockenes Filter filtriert und in einem Anteil des Filtrats der N nach der Mikro-Kjeldahlmethode in der Anordnung von *Bang* bestimmt. Die zu analysierenden Rest-N-Mengen wurden in ihrer Größenordnung so bemessen, daß sie stets das 10- bis 20fache des blinden Stickstoffs ausmachten. Der gesamte Reststickstoff war für uns also das Maß der Autolyse, und wir betrachten als Reststickstoff denjenigen N, der nach der Hitzekoagulation und Ausfällung aller Kolloide mit Hilfe des kolloidalen Eisenhydroxyds noch in Lösung blieb. Die Leerbestimmungen, die stets mit allen für die Hauptbestimmungen gebrauchten Lösungen in den richtigen Mengen angestellt worden sind, ergaben 0,015 bis 0,020 mg N.

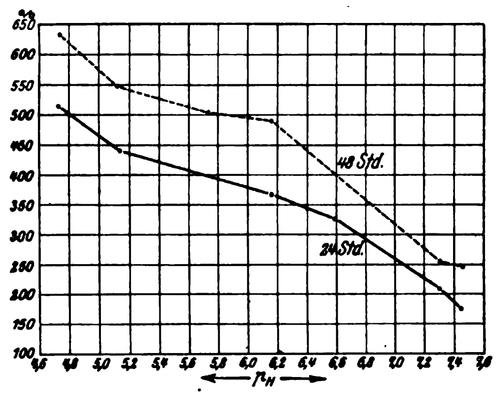


Abb. 1.

Die einzelnen Versuche verliefen wie folgt.

Versuch 1. 18 g Leberbrei, dazu 125 ccm destilliertes Wasser. In 5 ccm dieser Suspension sind 1,21 mg Rest-N. In je sieben Kolben werden je 10 ccm dieser Suspension gegeben, ferner je 10 ccm Pufferlösung (in Kolben 1 bis 4 m/15 Phosphatgemisch, in Kolben 5 bis 7 m/10 Acetatgemisch). Die sieben Kolben kamen für 48 Stunden in den Brutschrank (41°); nach 24 und 48 Stunden wurden aus jedem Kölbchen 2 × 2 ccm zur Rest-N-Bestimmung entnommen und je 4 ccm zur elektrometrischen p_H-Bestimmung verwendet. Es fanden sich in der Hälfte des enteiweißten Filtrats an Milligramm N.

Autolyse	1	2	3	4	5	6	7
p_H	7,45	7,31	6,59	6,16	5,73	5,12	4,74
Nach 24 Std.	0,20$_9$	0,25$_3$	0,39$_6$	0,44$_7$	—	0,53$_4$	0,62$_4$
„ 48 „	0,29$_8$	0,30$_6$	—	0,59$_6$	0,60$_9$	0,66$_6$	0,77$_9$

Setzen wir den anfangs bestimmten Rest-N aus 5 ccm der Ursprungssuspension gleich 100, so erhalten wir den in der Abb. 1 graphisch dargestellten Gang der Autolyse.

Dieser Vorversuch zeigt die Autolyse, gemessen an dem in Lösung gegangenen N in starker Abhängigkeit von dem p_H.

Es galt jetzt, das Optimum des Vorganges zu bestimmen. Hierzu brauchten wir Puffer, die weiter in das saure Gebiet hineinreichen, vor allem Weinsäure- und Milchsäuregemische.

Versuch 2. 18 g Leberbrei + 125 ccm destilliertes Wasser. In 5 ccm dieser Suspension sind 15,58 mg Gesamt-N und $0{,}90_6$ mg Rest-N. In sechs Kolben wurden je 10 ccm der Suspension und je 10 ccm Pufferlösung (in Kolben 1 und 2 m/10 Weinsäure-, in Kolben 3 bis 6 m/10 Milchsäuremischung gegeben), Temperatur 41°. Entnommen wurden nach 24 Stunden und 72 Stunden je 2 × 2 ccm zur Rest-N-Bestimmung, 4 ccm zur elektrometrischen p_H-Messung. Nach der Enteiweißung wurde auf 70 ccm (nach 72 Stunden auf 150 ccm) aufgefüllt, in den ersten zwei Kolben wurden je 40 ccm, in den anderen je 25 ccm zur Analyse benutzt. Gefunden wurden an Milligramm N nach 24 Stunden in den sechs Kolben bzw. 1. $0{,}50_6$,

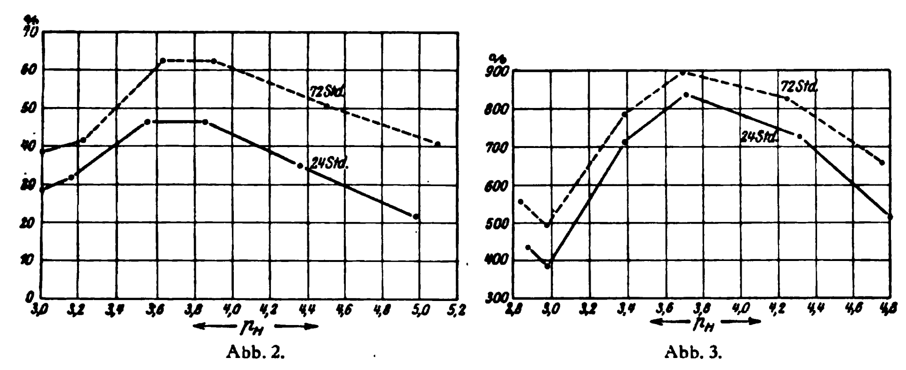


Abb. 2. Abb. 3.

2. $0{,}57_0$, 3. $0{,}51_7$, 4. $0{,}52_0$, 5. $0{,}38_7$, 6. $0{,}24_1$; nach 72 Stunden bzw. 1. $0{,}61_5$, 2. $0{,}68_3$, 3. $0{,}97_4$, 4. $0{,}97_6$, 5. $0{,}78_6$, 6. $0{,}63_1$. Auf 5 ccm der Suspension umgerechnet ergeben die Werte Milligramm N:

Autolyse		1	2	3	4	5	6
Nach 24 Std.	p_H	3,01	3,17	3,55	3,86	4,36	4,98
	mg N	$4{,}42_8$	$4{,}99_0$	$7{,}24_2$	$7{,}28_1$	$5{,}41_9$	$3{,}38_1$
„ 72 „	p_H	3,08	3,24	3,64	3,91	4,50	5,10
	mg N	$6{,}14_6$	6,58	$9{,}73_7$	$9{,}72_5$	$7{,}86_1$	$6{,}30_7$

Drücken wir die gefundenen N-Werte in Prozenten des Gesamt-N der Suspension aus, so erhalten wir den in Abb. 2 graphisch dargestellten Gang des autolytischen Vorganges.

Versuch 3. 7,5 g Leberbrei + 75 ccm destilliertes Wasser. In 5 ccm dieser Suspension sind $0{,}73_1$ mg Rest-N. Sonst alles wie im Versuch 2. Die enteiweißten Portionen wurden auf 50 ccm aufgefüllt, vom Filtrat 25 ccm verarbeitet. Auf 5 ccm der Suspension umgerechnet ergeben sich die Werte in Milligramm N:

Autolyse		1	2	3	4	5	6
Nach 24 Std.	p_H	2,88	2,98	3,39	3,72	4,32	4,81
	mg N	$3{,}18_5$	$2{,}82_1$	$5{,}21_5$	$6{,}12_5$	$5{,}29_9$	$3{,}71_0$
„ 72 „	p_H	2,84	2,98	3,38	3,70	4,25	4,75
	mg N	$4{,}07_4$	$3{,}64_0$	$5{,}70_5$	$6{,}55_9$	$6{,}05_5$	$4{,}81_3$

Beziehen wir diese Werte auf den ursprünglichen Rest-N der Suspension gleich 100 gesetzt, so erhalten wir die Abb. 3.

Aus den Versuchen 2 und 3 ist wieder die starke Abhängigkeit der Autolyse von der H'-Konzentration des Mediums zu erkennen. Bei p_H 3,6 bis 3,8 ist ein deutlicher Scheitelpunkt zu erkennen. Die nach 24 und 72 Stunden gemessenen p_H-Werte sind für jeden Versuch fast völlig übereinstimmend; die Pufferung ist also durchaus gelungen. In diesen Versuchen kamen teils Weinsäure-, teils Milchsäuregemische zur Anwendung. Um die Verhältnisse übersichtlicher zu gestalten, wurden zunächst Versuche angestellt, bei denen die ganze p_H-Reihe nur mit Weinsäuregemisch oder nur mit Milchsäuregemisch hergestellt wurde.

Versuch 4. 15 g Leberbrei mit 100 ccm destilliertem Wasser. In 5 ccm der Suspension 16,78 mg Gesamt-N, $0{,}91_4$ mg Rest-N. Puffer m/10 Weinsäuregemisch, 41°. Abnahme nach 24 Stunden. Nach der Enteiweißung auf 50 ccm aufgefüllt, vom Filtrat 25 ccm verarbeitet. Auf 5 ccm der Suspension umgerechnet ergeben die Werte Milligramm N.

Autolyse	1	2	3	4	5	6
p_H	2,93	3,51	3,76	4,62	5,01	5,20
mg N	$3{,}38_8$	$6{,}81_8$	$8{,}32_3$	$8{,}77_1$	$7{,}62_3$	$7{,}53_9$

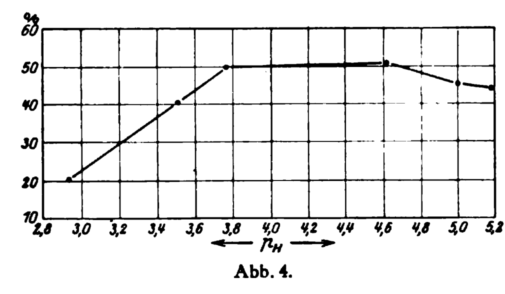


Abb. 4.

Diese Werte in Prozenten des Gesamt-N in 5 ccm Suspension ausgedrückt sind graphisch in Abb. 4 wiedergegeben.

Es liegt hier also eine breite optimale Zone vor. Es mußte daran gedacht werden, daß diese Verbreiterung des Optimums mit der Dauer der Autolyse in Zusammenhang stehen könnte. Um dies zu prüfen, wurden die folgenden Versuche angestellt.

Versuch 5. Lebersuspension wie üblich hergestellt. In 5 ccm der Suspension 12,46 mg Gesamt-N und 0,65 mg Rest-N. Pufferung mit m/10 Weinsäuregemisch. Zur Rest-N-Bestimmung 2 × 5 ccm enteiweißt, auf 50 ccm aufgefüllt, vom Filtrat je 25 ccm verarbeitet. Abnahme nach 48 und 96 Stunden. Auf 5 ccm der Suspension umgerechnet ergaben die Werte Milligramm N:

Autolyse		1	2	3	4	5	6
Nach 48 Std.	p_H (elektrom.)	2,77	2,94	3,60	4,07	4,60	5,14
	mg N	$2{,}81_4$	$3{,}59_8$	$5{,}71_2$	5,96	$5{,}97_1$	$5{,}41_8$
„ 96 „	p_H (elektrom.)	2,65	—	3,62	3,79	—	5,18
	mg N	$2{,}71_6$	$3{,}68_9$	$5{,}61_2$	$6{,}26_5$	$6{,}49_6$	6,81

Die Werte in Prozenten des Gesamt-N in 5 ccm Suspension ausgedrückt sind graphisch in Abb. 5 wiedergegeben.

Versuch 6. Lebersuspension wie üblich hergestellt. Pufferlösung wie im Versuch 5. In 5 ccm der Suspension 13,58 mg Gesamt-N und 0,70 mg Rest-N. Verarbeitung auf Rest-N wie im Versuch 5. Auf 5 ccm der Suspension umgerechnete Werte Milligramm N:

Autolyse		1	2	3	4	5	6
Nach 72 Std.	p_H (elektrom.)	2,72	—	3,65	4,15	4,69	5,18
	mg N	2,62	4,10	6,71	6,79	7,28	6,87
„ 120 „	p_H (elektrom.)	2,77	3,05	3,58	4,15	4,69	5,19
	mg N	2,64	4,12	6,29	6,87	6,76	6,91

Diese Werte in Prozenten des Gesamt-N in 5 ccm Lebersuspension ausgedrückt sind graphisch in Abb. 6 wiedergegeben.

Die Versuche 5 und 6 lehren, daß die Autolyse lange bevor aller Stickstoff in Lösung gegangen ist, halt macht. Ob es sich dabei um eine Erschöpfung des Ferments oder um eine Hemmung durch die gebildeten Eiweißabbauprodukte oder um ein echtes chemisches Gleichgewicht handelt, wird weiter unten untersucht werden. Der Vorgang strebt jedenfalls einem Endzustande zu, der am schnellsten bei dem optimalen p_H, dann aber allmählich auch bei den angrenzenden Reaktionen erreicht wird; so nähert sich die Kurve immer mehr und mehr einer Geraden. Je kürzer die Dauer der Fermentwirkung, um so deutlicher wird ein Optimum zutage treten. Die Versuche 5 und 6 zeigen weiterhin die einwandfreie Pufferung selbst bei einer Autolyse von 120 Stunden Dauer.

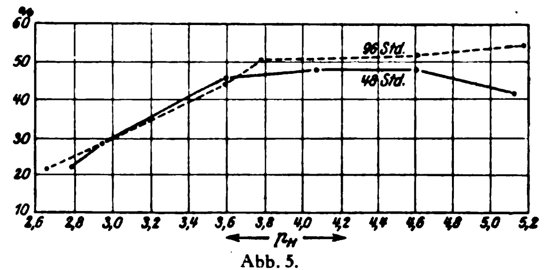


Abb. 5.

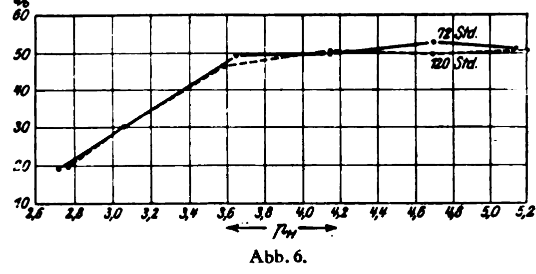


Abb. 6.

Bevor wir dazu übergingen, den autolytischen Vorgang innerhalb der ersten 24 Stunden zu studieren, stellten wir noch drei Versuche mit Milchsäuregemischpufferung an, um diese mit den Werten bei Weinsäuregemischpufferung zu vergleichen.

Versuch 7. 10 g Leberbrei mit 100 ccm destilliertem Wasser. In 5 ccm der Suspension 13,65 mg Gesamt-N und $0,65_4$ mg Rest-N. Pufferung mit m/10 Milchsäuregemisch. Zur Bestimmung des Rest-N 2 × 5 ccm enteiweißt, auf 50 ccm aufgefüllt, vom Filtrat 25 ccm verarbeitet. Auf 5 ccm der Suspension umgerechnete Werte Milligramm N:

Autolyse		1	2	3	4	5	6
Nach 24 Std.	p_H (elektrom.)	3,29	3,53	3,77	4,22	4,46	4,99
	mgN	$5,44_6$	5,61	5,86	5,02	—	4,09
„ 72 „	p_H (elektrom.)	3,24	3,48	3,72	4,15	4,39	4,85
	mgN	5,82	5,88	6,23	5,63	5,59	5,17

Diese Werte in Prozenten des Gesamt-N in 5 ccm Lebersuspension ausgedrückt sind graphisch in Abb. 7 wiedergegeben.

Versuch 8. 20 g Leberbrei mit 135 ccm destilliertem Wasser. In 5 ccm der Suspension 15,08 mg Gesamt-N und $0,75_9$ mg Rest-N. Pufferung mit

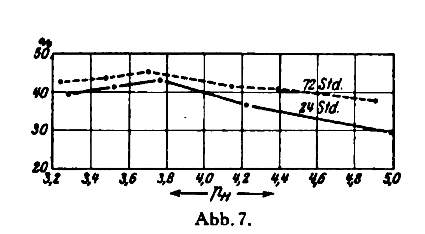


Abb. 7.

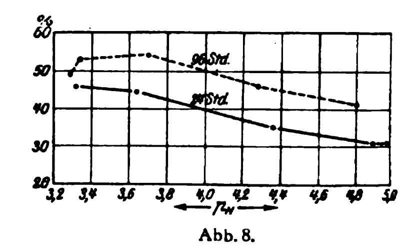


Abb. 8.

m/10 Milchsäuregemisch. Verarbeitung wie oben. Auf 5 ccm der Suspension umgerechnete Werte Milligramm N:

Autolyse		1	2	3	4	5	6
Nach 24 Std.	p_H (elektrom.)	—	3,32	3,64	4,31	4,90	5,02
	mg N	—	$6,90_5$	$6,69_5$	5,34	4,71	$4,69_6$
„ 96 „	p_H (elektrom.)	3,34	3,29	3,70	4,28	4,77	4,95
	mg N	8,04	7,37	$8,19_7$	$6,98_6$	6,517	—

Diese Werte in Prozenten des Gesamt-N in 5 ccm Lebersuspension ausgedrückt sind graphisch in Abb. 8 wiedergegeben.

Versuch 9. 10 g Leberbrei mit 100 ccm destilliertem Wasser. In 5 ccm der Suspension 13,60 mg Gesamt-N und 0,687 mg Rest-N. Pufferlösung und Verarbeitung des Filtrats wie im Versuch 8. Auf 5 ccm der Suspension umgerechnete Werte Milligramm N:

Autolyse		1	2	3	4	5
Nach 24 Std.	p_H (elektrom.)	3,43	3,58	4,28	4,75	—
	mg N	6,64	6,16	5,72	4,96	4,96
„ 96 „	p_H (elektrom.)	3,46	3,58	4,28	4,75	4,84
	mg N	7,42	7,07	$6,84_6$	6,72	6,76

Die Werte in Prozenten des Gesamt-N in 5 ccm Lebersuspension ausgedrückt sind graphisch in Abb. 9 wiedergegeben.

Die Versuche 7 und 8 lassen das Optimum um p_H 3,8 noch erkennen; im Versuch 9 kommt dies nicht zum Ausdruck. Aber auch dieser Versuch zeigt, daß unter den gegebenen Bedingungen das Maß der Autolyse etwa 50 Proz. des Gesamt-N beträgt.

II. Die bisherigen Versuche ergeben, was die Abhängigkeit der Autolyse von der $H^{\cdot}$-Ionenkonzentration des Mediums betrifft, bei der Milchsäure- und Weinsäurepufferung eine gute Übereinstimmung. Noch genauer dürften jedoch über eine etwaige Anionenwirkung Versuche unterrichten, bei denen die Leber während des autolytischen Prozesses der Einwirkung einer Milchsäure- und einer Weinsäurereihe in Parallelversuchen gleichzeitig ausgesetzt wurde.

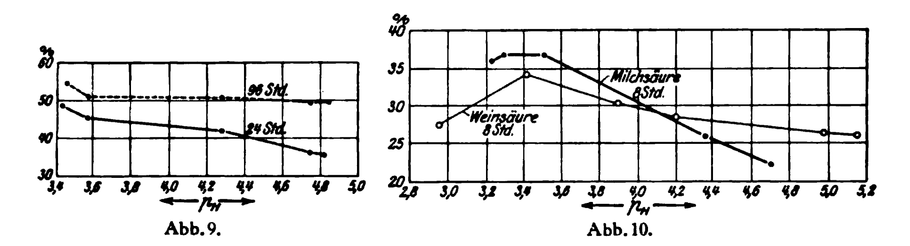


Abb. 9. Abb. 10.

Im folgenden sind einige solcher Doppelversuche angegeben.

Versuch 10. 12 g Leberbrei und 135 ccm destilliertes Wasser. In 5 ccm der Lebersuspension 12,25 mg Gesamt-N und 0,74 mg Rest-N. Pufferung in Reihe A mit Milchsäuregemisch, in Reihe B mit Weinsäuregemisch. Verarbeitung wie in den früheren Versuchen. Abnahme nach 8 Stunden. Auf 5 ccm der Lebersuspension umgerechnete Werte Milligramm N sind:

Autolyse (8 Std.)		1	2	3	4	5	6
A. Milchsäurereihe	p_H (elektrom.)	3,24	3,29	3,50	4,36	4,70	—
	mg N	4,41	4.52	4,50	3,15	2,74	—
B. Weinsäurereihe	p_H (elektrom.)	2,96	3,41	3,89	4,20	4,97	5,15
	mg N	3,37	$4{,}20_7$	$3{,}74_5$	3,50	3,23	3,23

Diese Werte in Prozenten des Gesamt-N in 5 ccm Lebersuspension sind graphisch in Abb. 10 wiedergegeben.

Versuch 11. 17 g Leberbrei und 135 ccm destilliertes Wasser. In 5 ccm der Lebersuspension 13,40 mg Gesamt-N, 0,99 mg Rest-N. Pufferung in Reihe A mit Weinsäuregemisch, in Reihe B mit Milchsäuregemisch. Verarbeitung wie in früheren Versuchen. Abnahme nach 4 Stunden

und nach 8 Stunden. Auf 5 ccm der Lebersuspension umgerechnete Werte Milligramm N sind:

Autolyse (4 Std.)		1	2	3	4	5
A. Weinsäure-reihe	p_H (elektrom.)	3,03	3,46	3,75	4,23	5,01
	mg N	3,15	3,71	3,66	3,27	2,88
B. Milchsäure-reihe	p_H (elektrom.)	—	3,38	3,65	4,43	4,77
	mg N	—	3,99	3,91	2,68	2,23
Autolyse (8 Std.)						
A. Weinsäure-reihe	p_H (elektrom.)	3,03	3,46	3,75	4,23	5,01
	mg N	4,17	5,12	4,87	4,03	3,47
B. Milchsäure-reihe	p_H (elektrom.)	—	3,38	3,65	4,43	4,77
	mg N	—	5,18	$5,16_6$	3,58	3,12

Diese Werte in Prozenten des Gesamt-N in 5 ccm Lebersuspension ausgedrückt sind graphisch in Abb. 11 wiedergegeben.

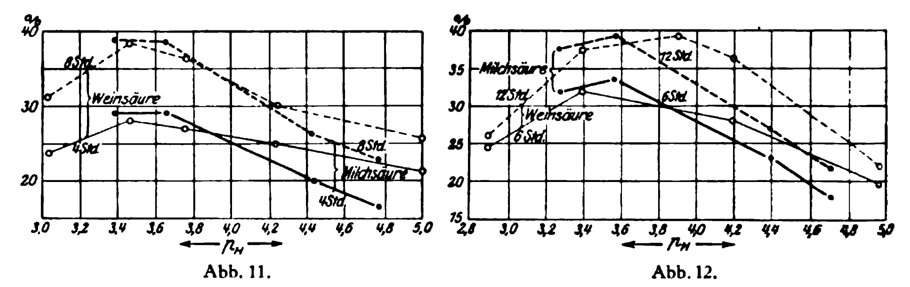


Abb. 11. Abb. 12.

Versuch 12. 15,9 g Leberbrei und 135 ccm destilliertes Wasser. In 5 ccm der Suspension 15,33 mg Gesamt-N, 0,65 mg Rest-N. Pufferung wie im vorigen Versuch. Abnahme nach 6 und 12 Stunden. Auf 5 ccm der Lebersuspension umgerechnete Werte Milligramm N sind:

Autolyse		1	2	3	4	5
		A. Milchsäurereihe.				
	p_H (elektrom.)	3,29	3,58	4,39	4,70	
Nach 6 Std. .	mg N	4,88	5,11	3,53	2,72	
„ 12 „ .	mg N	5,77	$5,99_7$	4,14	3,34	
		B. Weinsäurereihe.				
	p_H (elektrom.)	2,91	3,41	3,91	4,19	4,97
Nach 6 Std. .	mg N	$3,74_6$	4,92	$4,52_7$	4,33	$3,01_6$
„ 12 „ .	mg N	3,99	5,75	6,06	$5,63_6$	3,39

Diese Werte in Prozenten des Gesamt-N in 5 ccm der Lebersuspension sind graphisch in Abb. 12 wiedergegeben.

Die angeführten Doppelversuche zeigen, wie dies namentlich aus den graphischen Darstellungen deutlich ersichtlich ist, folgendes Verhalten. Während die Autolyse bei optimaler H-Ionenkonzentration in beiden Pufferlösungen fast in gleichem Tempo verläuft oder eine

gewisse Beschleunigung bei der Milchsäurepufferung erkennen läßt, ist ihr Fortgang bei nicht optimalem p_H deutlich anders, ja entgegengesetzt. Die Kurven weisen mit auffallender Regelmäßigkeit einen Schnittpunkt auf und bilden so in allen drei Versuchen je zwei Zonen; in der einen, der optimalen $H^{\bullet}$-Konzentration entsprechenden, verläuft die Milchsäurekurve dicht bei oder ein wenig über der Weinsäurekurve, während in der anderen, der optimalen Reaktion nach der alkalischen Seite hin angrenzenden, die Weinsäurekurve über der Milchsäurekurve verläuft. In welchem Sinne die beiden Pufferlösungen bei gleichem p_H den Vorgang beeinflussen, läßt sich daher ohne weiteres gar nicht angeben. Einer sehr deutlichen Beschleunigung des autolytischen Vorganges bei einem p_H von ungefähr 5,0 und Weinsäurepufferung steht eine deutlich erkennbare Beschleunigung bei einem p_H von 3,5 und Milchsäurepufferung gegenüber.

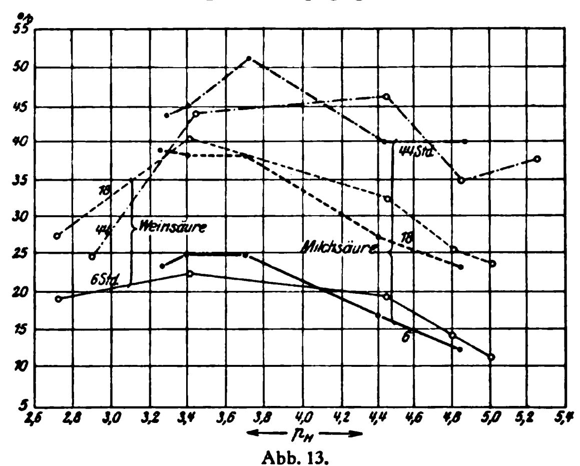


Abb. 13.

In den folgenden zwei Versuchsreihen bei längerer Dauer der Autolyse finden sich dieselben Verhältnisse wieder. Im Versuche 14 ist die beschleunigende Wirkung der Milchsäure, die in den bisherigen Versuchen nur angedeutet ist, besonders stark ausgeprägt.

Versuch 13. 18 g Leberbrei und 150 ccm destilliertes Wasser. In 5 ccm der Suspension sind 13,12 mg Gesamt-N und 0,69 mg Rest-N. Pufferung wie im vorigen Versuch. Thermostat 31°. Abnahme nach 6, 18 und 44 Stunden. Auf 5 ccm der Lebersuspension umgerechnete Werte Milligramm N sind:

Autolyse		1	2	3	4	5
		A. Milchsäurereihe.				
	p_H (elektrom.)	3,26	3,39	3,70	4,41	4,84
Nach 6 Std. .	mg N	3,09$_9$	3,29$_6$	3,31	2,23	1,66
„ 18 „ .	mg N	5,09	5,03	5,03	3,58	3,06
„ 44 „ .	mg N	5,77	5,99	6,68	5,25	5,29

Autolyse		1	2	3	4	5
		B. Weinsäurereihe.				
	p_H (elektrom.)	2,72	3,41	4,45	4,80	5,16
Nach 6 Std.	mg N	2,59	2,99	2,65	1,89	1,55
„ 18 „	mg N	3,62	5,21	4,59	3,38	3,16
„ 44 „	mg N	3,28	5,74	6,05	4,68	5,02

Abb. 14.

Diese Werte in Prozenten des Gesamt-N in 5 ccm der Suspension sind graphisch in Abb. 13 wiedergegeben.

Versuch 14. 13 g Leberbrei und 175 ccm destilliertes Wasser. In 5 ccm der Suspension 9,73 mg Gesamt-N und 0,53 mg Rest-N. Pufferung wie im vorigen Versuch. Abnahme nach 6, 20, 45 und 70 Stunden. Auf 5 ccm der Lebersuspension umgerechnete Werte Milligramm N:

Autolyse		1	2	3	4	5
		A. Milchsäurereihe.				
	p_H (elektrom.)	3,17	3,29	3,63	4,34	4,78
Nach 6 Std.	mg N	2,92	3,49	4,02	2,81	2,42
„ 20 „	mg N	3,08	3,53	4,58	3,99	3,12
„ 45 „	mg N	3,08	3,84	4,66	4,16	3,29
	p_H (elektrom.)	3,17	3,27	3,67	4,36	4,74
„ 70 „	mg N	3,19	4,04	5,02	4,30	3,80
		B. Weinsäurereihe.				
	p_H (elektrom.)	2,71	3,29	4,25	4,78	5,04
Nach 6 Std.	mg N	1,62	2,84	2,99	2,69	2,21
„ 20 „	„	1,19	3,02	3,52	3,46	2,96
„ 45 „	„	1,02	2,89	3,58	3,54	3,32
	p_H (elektrom.)	2,92	3,27	4,29	4,76	5,11
„ 70 „	mg N	0,97	3,55	3,99	3,98	3,73

Diese Werte in Prozenten des Gesamt-N in 5 ccm der Suspension sind graphisch in Abb. 14 wiedergegeben.

Diese letzten Versuche stimmen im ganzen mit den drei vorhergehenden überein. Das wesentliche all dieser Kurven ist ein Optimum der Autolyse in stark saurem Gebiete, in der Milchsäurereihe etwas schärfer ausgeprägt bei etwa p_H 3,4 bis 3,8, in der Weinsäurereihe

ist der Abfall weniger steil, zuweilen bei p_H 4,0 bis 4,4 nur wenig abnehmend. Eine gewisse beschleunigende Wirkung der Milchsäure im optimalen Gebiete ist unverkennbar; außerhalb des Optimums kreuzen sich die Kurven, und das Ausmaß der Autolyse wird im Weinsäuregemisch stärker.

III. Es mußte nach diesen Untersuchungen im optimalen sauren Gebiete die p_H-Reihe nach der alkalischen Seite hin erweitert werden. Hierzu wurde zunächst das Acetatgemisch benutzt, mit dem es gelang, bis zu einem p_H von 6,0 zu kommen. Die neutrale und alkalische Reaktion wurde dann mit Phosphatgemischen hergestellt und schließlich wurde noch Biphthalat mit Natronlauge bzw. Salzsäure angewendet, um mit den verschiedenen Pufferlösungen eine etwaige Anionenwirkung besser zur Geltung zu bringen.

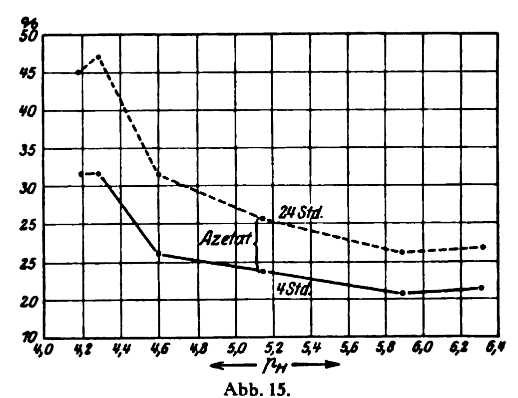


Abb. 15.

Versuch 15. Lebersuspension wie in früheren Versuchen. In 5 ccm der Suspension 16,34 mg Gesamt-N und 1,03 mg Rest-N. Pufferlösung: Acetatgemisch m/10. Abnahme nach 4 und 24 Stunden. Auf 5 ccm Suspension umgerechnet Milligramm N:

Autolyse		1	2	3	4	5	6
	p_H (elektrom.)	4,19	4,28	4,60	5,15	5,89	6,31
Nach 4 Std.	mg N	5,16	5,20	3,43	3,07	2,58	2,69
	p_H (elektrom.)	4,19	4,28	4,60	5,15	5,89	6,31
„ 24 „	mg N	7,30	. 7,69	5,20	4,19	3,48	3,57

Diese Werte in Prozenten des Gesamt-N in 5 ccm Suspension angegeben sind graphisch in Abb. 15 wiedergegeben.

Versuch 16. Lebersuspension wie in früheren Versuchen. Pufferlösung wie im Versuch 15. (In 10 ccm Suspension wurden diesmal 30 ccm Pufferlösung gegeben.) In 5 ccm der Suspension 19,34 mg Gesamt-N und 1,12 mg Rest-N. Abnahme nach 4, 24, 72 Stunden. Auf 5 ccm Suspension umgerechnet wurden gefunden Milligramm N:

Autolyse		1	2	3	4	5	6
	p_H (elektrom.)	3,84	3,98	4,40	4,98	5,64	6,03
Nach 4 Std.	mg N	5,02	4,97	4,00	2,62	2,20	2,00
„ 24 „	„	7,52	7,60	6,42	3,93	2,94	2,61
	p_H (elektrom.)	3,91	4,06	4,47	4,98	5,68	6,01
„ 72 „	mg N	7,77	8,19	6,99	4,92	3,90	3,33

Diese Werte in Prozenten des Gesamt-N in 5 ccm Suspension angegeben sind graphisch in Abb. 16 wiedergegeben.

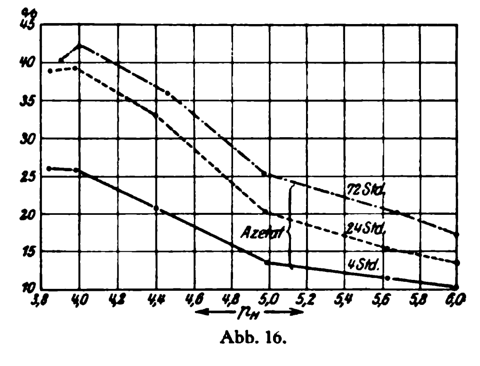


Abb. 16.

Die Kurven der Versuche 15 und 16 zeigen den Ablauf der Autolyse zwischen p_H 3,8 und 6,0. Bereits von etwa p_H 4,0 an sinkt das Ausmaß der Autolyse äußerst schnell.

Um den H-Bereich weiter nach der alkalischen Reaktion auszudehnen, wurden in den folgenden Versuchen Phosphatpufferungen angestellt.

Versuch 17. 12,5 g Leberbrei und 100 ccm destilliertes Wasser. Pufferung mit Phosphatmischungen (m/15 Lösung), und zwar 30 ccm der Lösung auf 10 ccm Suspension. In 5 ccm Suspension 16,45 mg Gesamt-N und 0,86 mg Rest-N. Abnahme nach 4, 24 und 48 Stunden. Auf 5 ccm Suspension umgerechnet wurden gefunden Milligramm N:

Autolyse		1	2	3	4	5	6
	p_H (elektrom.)	5,78	6,01	6,38	6,85	7,31	7,53
Nach 4 Std.	mg N	2,89	2,73	2,17	1,95	2,05	2,10
„ 24 „	mg N	5,26	4,29	3,17	2,44	2,44	2,40
	p_H (elektrom.)	5,80	6,03	6,39	6,87	7,33	7,70
„ 48 „	mg N	6,16	5,12	3,39	2,60	2,67	2,58

Diese Werte in Prozenten des Gesamt-N in 5 ccm Suspension angegeben sind graphisch in Abb. 17 wiedergegeben.

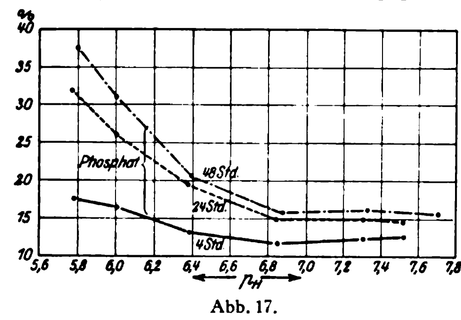


Abb. 17.

Wie ersichtlich, ist im Gebiete von p_H 5,8 bis 6,4 im Vergleich mit der Autolyse mit Acetatpuffer eine deutliche Förderung zu beobachten. Um diesen Befund sicherzustellen, wurden Versuche gleichzeitig mit Acetat- und Phosphatpuffer angestellt. Da die letzten p_H-Werte der Acetatreihe sich mit den ersten der Phosphatreihe decken, war ein Vergleich durchführbar.

Versuch 18. 7 g Leberbrei und 75 ccm destilliertes Wasser. In 5 ccm der Suspension 13,42 mg Gesamt-N und 0,63 mg Rest-N. Pufferung mit

Acetat- und mit Phosphatmischung. Abnahme nach 4 und 22 Stunden. Auf 5 ccm Suspension umgerechnet wurden gefunden Milligramm N:

Autolyse		Phosphatpuffer 1	2	3	Acetatpuffer 4	5	6
	p_H	5,09	5,87	6,24	6,01	6,21	6,57
Nach 4 Std.	mg N	1,75	1,66	1,69	2,23	2,11	1,69
„ 22 „	mg N	2,85	2,59	2,63	3,40	3,02	2,08

Diese Werte in Prozenten des Gesamt-N in 5 ccm Suspension angegeben sind graphisch in Abb. 18 wiedergegeben.

Dieser Doppelversuch zeigt ebenfalls deutlich, daß die Autolyse bei Phosphatpufferung erheblich schneller verläuft als bei Acetatpufferung. Bei etwa p_H 6 sind die Umsätze bei der Autolyse bei Phosphatgegenwart viel höher als bei Acetatgegenwart, wenn auch die Autolyse bei weitem nicht den Grad bei dem Optimum

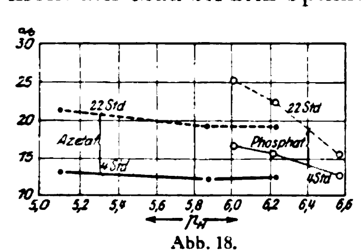


Abb. 18.

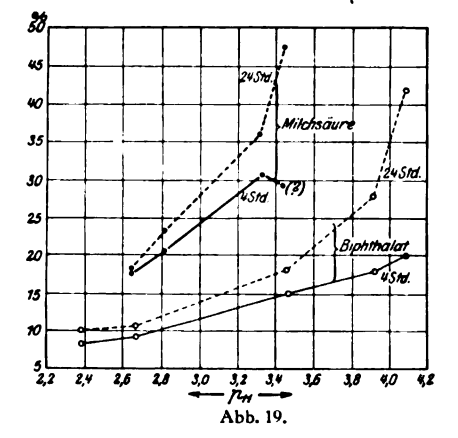


Abb. 19.

in saurer Reaktion (50 Proz.) erreicht. Von p_H 6 ab fällt dann auch bei Phosphatpufferung die Autolyse steil ab.

Als letztes Puffergemisch benutzten wir Kaliumbiphthalat (m/5) zunächst mit HCl (m/5) nach *Clark* und *Lubs* und verglichen gleich die Wirkung mit der eines Milchsäuregemisches von gleichem p_H.

Versuch 19. Leberbrei wie üblich. In 5 ccm der Suspension 10,20 mg Gesamt-N und $0{,}60_8$ mg Rest-N. Pufferung mit Lactat- und Biphthalat-HCl-Gemisch. Abnahme nach 4 und 24 Stunden. Auf 5 ccm Suspension umgerechnet wurden gefunden Milligramm N:

Autolyse		1	2	3	4	5
		Milchsäurereihe.				
	p_H (elektrom.)	2,64	2,81	3,32	3,43	
Nach 4 Std.	mg N	1,80	2,09	3,12	2,94	
„ 24 „	mg N	1,85	2,35	3,68	4,86	

Autolyse		1	2	3	4	5
		Phthalatreihe.				
	p_H (elektrom.)	2,38	2,66	3,46	3,92	4,09
Nach 4 Std.	mg N	0,84	0,94	1,54	1,81	2,05
„ 24 „	mg N	1,02	1,07	1,84	2,82	4,23

Diese Werte in Prozenten des Gesamt-N in 5 ccm Suspension angegeben sind graphisch in Abb. 19 wiedergegeben.

Auch bei diesem Puffer findet man also ein Optimum in stark saurem Gebiete, nur ist dieses ein wenig nach der alkalischen Seite hin (bei etwa p_H 4,2) verschoben.

Die folgenden Versuche, bei denen ebenfalls Phthalatpuffer angesetzt sind und infolge NaOH-Zusatz auf weniger saurem Gebiete sich bewegten, können als Fortsetzung dieser Kurve betrachtet werden.

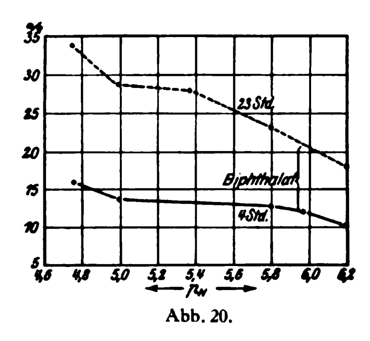


Abb. 20.

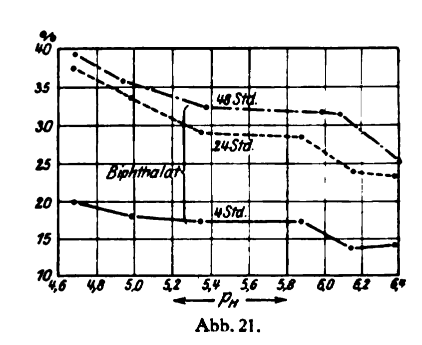


Abb. 21.

Versuch 20. Lebersuspension wie üblich. In 5 ccm der Suspension 16,78 mg Gesamt-N und 0,87 mg Rest-N. Puffer: Kaliumbiphthalat-NaOH (m/5 Lösung). Abnahme nach 4 und 23 Stunden. Auf 5 ccm Suspension umgerechnet wurden gefunden Milligramm N:

Autolyse		1	2	3	4	5	6
	p_H (elektrom.)	4,76	4,99	5,37	5,80	5,97	6,19
Nach 4 Std.	mg N	2,66	2,30	—	2,12	2,01	1,70
„ 23 „	mg N	5,66	4,83	4,70	3,90	3,50	3,02

Diese Werte in Prozenten des Gesamt-N in 5 ccm Suspension angegeben sind graphisch in Abb. 20 wiedergegeben.

Versuch 21. Lebersuspension wie üblich. In 5 ccm der Suspension 11,11 mg Gesamt-N und 0,63 mg Rest-N. Pufferung wie oben. Abnahme nach 4, 24 und 48 Stunden. Auf 5 ccm Suspension umgerechnet wurden gefunden Milligramm N:

Autolyse		1	2	3	4	5	6
	p_H (elektrom.)	4,68	4,98	5,35	5,87	6,13	6,38
Nach 4 Std.	mg N	2,22	2,02	1,93	1,93	1,50	1,59
„ 24 „	mg N	4,17	3,73	3,24	3,17	2,66	2,59
	p_H (elektrom.)	4,68	4,94	5,38	5,99	6,08	6,42
„ 48 „	mg N	4,38	3,98	3,59	3,53	2,85	2,80

Diese Werte in Prozenten des Gesamt-N in 5 ccm Suspension angegeben sind graphisch in Abb. 21 wiedergegeben.

Im letzten Versuche in dieser Richtung wurden Parallelbestimmungen mit Biphthalat-NaOH und Lactatmischung angestellt.

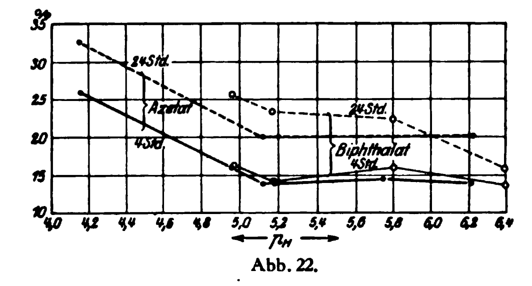


Abb. 22.

Versuch 22. Lebersuspension wie üblich. In 5 ccm der Suspension 10,73 mg Gesamt-N und 0,52 mg Rest-N. Pufferung mit Biphthalat-NaOH und mit Lactatgemisch. Abnahme nach 4 und 24 Stunden. Auf 5 ccm Suspension umgerechnet wurden gefunden Milligramm N:

Autolyse		1	2	3	4
		Biphthalatreihe.			
	p_H (elektrom.)	4,95	5,17	5,80	6,42
Nach 4 Std.	mg N	1,68	1,47	—	1,45
„ 24 „	mg N	2,76	2,50	2,43	1,68
		Acetatreihe.			
	p_H (elektrom.)	4,15	5,12	5,74	6,21
Nach 4 Std.	mg N	2,78	1,48	1,56	1,48
„ 24 „	mg N	3,46	2,16	2,13	2,17

Diese Werte in Prozenten des Gesamt-N in 5 ccm Suspension angegeben sind graphisch in Abb. 22 wiedergegeben.

Im wesentlichen verläuft die Autolyse in beiden Reihen gleich, nur ist in der Biphthalatreihe eine geringe Beschleunigung des Vorganges zu beobachten.

Die bisherigen Versuche zeigen deutlich die außerordentlich große Bedeutung der H'-Konzentration für den Ablauf der Autolyse. Im stark sauren Gebiete, bei etwa p_H 3,6 bis 4,0, findet man eine optimale Wirkung des autolytischen Ferments (oder der autolytischen Fermente), und dieses optimale Gebiet ließ sich bei Anwendung verschiedener Pufferlösungen (Milchsäure-, Weinsäure-, Essigsäuregemisch) beobachten. Bei Phthalat-HCl-Mischungen war das Optimum ein wenig

nach dem alkalischen Gebiete zu verschoben (etwa p_H 4,2). Dann fällt der Grad der Autolyse stets stark, um bereits bei p_H 5 auf geringe Bruchteile der optimalen Wirkung herabzusinken. Nur bei Phosphatgemischen erhebt sich die Autolyse bei etwa p_H 6 über das Maß des bei anderen Pufferlösungen bei diesem p_H gefundenen, um mit zunehmender Alkalität wieder rasch zu sinken. — Eine „Förderung" oder „Hemmung" durch gewisse Säuren läßt sich bei Betrachtung nur eines Punktes der p_H-Reihe im Verlaufe der Autolyse nicht feststellen, da im optimalen und im nicht optimalen Gebiete die Verhältnisse ganz verschieden sein können. Noch eingehender werden wir uns mit diesem Verhalten bei der Wirkung der Neutralsalze auf die Autolyse zu beschäftigen haben.

IV. In den bisherigen Versuchen wurde die gesamte Rest-N-Menge, die nach Koagulation und Eisenbehandlung des Autolysats gefunden wurde, als Maß der Autolyse angegeben. Es war nun nötig, einzelne Fraktionen dieses Rest-N genauer festzustellen. Zu diesem Zwecke wurde der Amino-N nach *Folin*[1]), der NH_3-N nach *Bang*, der Harnstoff-N mittels der Ureasemethode bestimmt. Ferner wurde in mehreren Versuchen der sogenannte peptidgebundene Stickstoff als Amino-N nach *Folin* nach vorhergehender Säurespaltung der betreffenden Fraktion festgestellt. — Außer der gewöhnlich angewandten Enteiweißung mittels Aufkochens und Kolloidfällung sind auch Ultrafiltrate der Lebersuspension auf Gesamt-N und Amino-N verarbeitet worden und diese Zahlen mit den auf die andere Art erhaltenen Werten verglichen.

Die ersten Versuche stellten wir im Optimum oder seiner unmittelbaren Nähe an (p_H 3,6 bis 4,0; Milchsäurepufferung). Wir nahmen an, daß der peptische Charakter des autolytischen Ferments, der sich aus der Lage des optimalen p_H mit Wahrscheinlichkeit annehmen ließ, sich auch in der Natur der Spaltprodukte äußern würde. Die bei neutraler Reaktion geleitete Autolyse dürfte dann, falls hier ein tryptisches Ferment zur Wirkung käme, in der Zusammensetzung ihrer Spaltprodukte ein anderes Bild geben. Wir ließen daher einen Versuch bei p_H 6,8 folgen.

Versuch 23. p_H 3,9. Gesamt-N 12,2 mg.

	Anfangswert		3 Std.		6 Std.		26 Std.	
	mg	Proz.	mg	Proz.	mg	Proz.	mg	Proz.
Gesamt-Rest-N . .	0,85	7	3,30	27,5	4,71	38,6	6,91	56,6
Amino-N	0,195	1,6	0,62	5,1	1,19	9,8	1,20	9,8
NH_3-N	0,10	etwa 1	0,3	2,5	—	—	0,50	4,0
Harnstoff-N . . .	0,10	„ 1	$0{,}10_5$	etwa 1	—	—	$0{,}12_5$	etwa 1

Im Ultrafiltrat zu Beginn 0,77 mg Rest-N, nach 6 Stunden 4,79 mg Rest-N.

[1]) Journ. of biol. Chem. 51, 377, 1921.

Versuch 24. p_H 4,0. Gesamt-N 21,17 mg.

	Anfangswert		3 Std.		7 Std.		26 Std.	
	mg	Proz.	mg	Proz.	mg	Proz.	mg	Proz.
Gesamt-Rest-N . .	1,20	5,68	3,37	15,9	5,12	24,2	8,64	40,8
Amino-N	0,44	2,1	1,33	6,3	2,22	10,5	3,15	14,9
NH_3-N + Harnstoff-N	0,13	0,6	0,14	0,7	0,25	1,2	0,52	2,5

Im Ultrafiltrat Milligramm N:

	Anfangswert	3 Std.	7 Std.	26 Std.
Gesamt-Rest-N .	1,29	3,66	5,42	9,40
Amino-N	0,40	1,33	2,33	3,57

Versuch 25. p_H 3,60. Gesamt-N 16,97 mg.

	Beginn		4 Std.		24 Std.		48 Std.	
	mg	Proz.	mg	Proz.	mg	Proz.	mg	Proz.
Gesamt-Rest-N . .	0,68	4	4,41	26	7,33	43	9,32	55
Amino-N	0,23	1,4	1,42	8,4	2,68	15,8	3,25	19,1
NH_3-N + Harnstoff-N	0,24	1,5	0,31	1,9	0,86	5,1	0,92	5,4

Versuch 26. p_H 6,8 (Phosphatpuffer). Gesamt-N 18,29 mg.

	Anfangswert		4 Std.		24 Std.		72 Std.	
	mg	Proz.	mg	Proz.	mg	Proz.	mg	Proz.
Gesamt-Rest-N . .	0,90	4,9	1,07	5,9	1,14	6,3	1,45	7,9
Amino-N	0,25	1,4	0,32	1,8	0,45	2,5	0,56	3,0
NH_3-N + Harnstoff-N	0,27	1,6	—	—	0,29	1,6	—	—

Im Ultrafiltrat nach 4 Stunden 1,01, nach 24 Stunden 1,17 mg Rest-N; nach 4 Stunden 0,34, nach 24 Stunden 0,38 mg Amino-N.

Diese Versuche zeigen demnach zunächst, in Übereinstimmung mit den oben mitgeteilten Befunden der Arbeit, daß nach 24stündiger optimal geleiteter Autolyse die in der Lösung befindliche Stickstoffmenge ungefähr 50 Proz. des Gesamt-N der Suspension beträgt. Was die Zusammensetzung des Rest-N anlangt, so spielen Harnstoff und Ammoniak eine verhältnismäßig geringe Rolle, wenn auch die Vermehrung des Ammoniaks im Laufe der Autolyse deutlich in Erscheinung tritt. Die Fraktion des Amino-N wies über Erwarten geringe Werte auf. Während in zahlreichen früheren Untersuchungen der Anteil des N der sogenannten Monoaminosäuregruppe zwischen 60 und 80 Proz. des Gesamt-N betrug und dementsprechend die Spaltung zu den letzten Abbaustufen als hoch angesehen werden mußte, schwankt der von uns gemessene Amino-N nur zwischen 25 und 35 Proz. des gesamten

Rest-N. Die Menge der wirklich vorhandenen, freien Monoaminosäuren dürfte nach den gleich unten mitgeteilten Bestimmungen der Polypeptidfraktion noch geringer sein. Bemerkenswert ist es auch, daß bei der geringen, aber doch deutlichen Autolyse bei fast neutraler Reaktion (Versuch 26) der prozentuelle Anteil an Amino-N im Rest-N durchaus nicht vergrößert ist gegenüber den Zahlen, die aus dem optimalen Gebiete stammen, so daß Anhaltspunkte für ein tryptisches Ferment in dieser Versuchsanordnung nicht gefunden wurden. – Schließlich sei noch darauf hingewiesen, daß die Methode der Ultrafiltration fast dieselben Rest-N-Werte ergab wie die von uns meist angewandte kombinierte Enteiweißungsmethode.

Die Bestimmung des „peptidgebundenen“ Stickstoffs erfolgte mit Hilfe der Säurehydrolyse mit einer vorhergehenden und einer nachfolgenden Amino-N-Bestimmung nach der *Folin*schen Methode. Der erste Versuch wurde auf der sauren, ein zweiter auf der alkalischen Seite des Optimums angestellt.

Versuch 27. p_H 3,2 (Pufferung mit Milchsäure). Gesamt-N 17,2 mg.

	Anfangswert		4 Std.		20 Std.	
	mg	Proz.	mg	Proz.	mg	Proz.
Gesamt-Rest-N	0,87	5,1	2,93	17	4,35	25,3
Amino-N	0,30	1,8	$0{,}70_7$	4,1	1,20	7,0
Amino-N + Polypeptid-N	0,74	4,3	2,48	14,4	3,82	22,2

Versuch 28. p_H 4,3 (Pufferung mit Milchsäure). Gesamt-N 15,4 mg.

	Anfangswert		4 Std.		24 Std.		48 Std.	
	mg	Proz.	mg	Proz.	mg	Proz.	mg	Proz.
Gesamt-Rest-N . .	1,38	9	2,86	18,5	5,79	37,6	6,26	40,7
Amino-N	0,28	1,8	0,74	4,8	1,12	7,3	1,43	9,3
Amino-N + Polypeptid-N	1,18	7,7	2,49	16,2	5,22	33,9	5,72	37,1

Aus diesen Versuchen ergibt sich, daß der Hauptanteil des Rest-N einem Gemenge von Polypeptiden zukommt, ein Befund, der wiederum für die peptische Natur des hier wirksamen Ferments spricht. Die von mehreren Autoren auch im alkalischen Gebiete aufgefundene erhebliche Fermentwirkung tryptischen oder ereptischen Charakters hat sich bisher unseren Feststellungen gänzlich entzogen.

V. Um eine eventuelle Spaltung im alkalischen Gebiete nachweisen zu können, übertrugen wir das saure Autolysat in ein alkalisches Medium und prüften dann das weitere Verhalten des Verlaufes der Autolyse[1].

[1] Vgl. zu diesem Punkt vor allem die Arbeiten von *S. G. Hedin*, Zeitschr. physiol. Chem. **122**, 307, 1922; Journ. of biol. Chem. **54**, 177, 1922.

Dabei wurde so verfahren, daß die Autolyse bei saurer Reaktion angesetzt wurde, nach 48 Stunden teilte man das Autolysat, und zwar wurde der eine Teil bei der bisherigen sauren Reaktion belassen, der andere Teil wurde durch Phosphat und NaOH auf eine alkalische Reaktion gebracht; nach weiteren 24 Stunden wurden beide Portionen analysiert.

Versuch 29. p_H 3,96 (Milchsäurepuffer). Gesamt-N 10,8 mg.

Gesamt-Rest-N: Anfangswert 1,33 mg (12,3 Proz.), nach 36 Stunden 5,17 mg (47,8 Proz.).

Amino-N: Anfangswert 0,76 mg (7 Proz.), nach 36 Stunden 1,64 mg (15,2 Proz.).

Nach 36 Stunden wurde ein Teil mit NaOH neutralisiert, p_H 6,88. Dann wurde gefunden:

I. Im sauren Autolysat:

Gesamt-Rest-N: nach 60 Stunden 5,31 mg (49,2 Proz.), nach 84 Stunden 6,10 mg (56,5 Proz.).

Amino-N: nach 60 Stunden 2,0 mg (18,5 Proz.), nach 84 Stunden 2,07 mg (19,2 Proz.).

II. Im neutralisierten Autolysat:

Gesamt-Rest-N: nach 60 Stunden 5,49 mg (50,8 Proz.), nach 84 Stunden 5,81 mg (53,7 Proz.).

Amino-N: nach 60 Stunden 2,06 mg (19,1 Proz.), nach 84 Stunden 2,32 mg (21,5 Proz.).

Die Autolyse ging demnach in dem neutralisierten Autolysat nicht weiter. Da es immerhin möglich war, daß dieses Verhalten durch die unzureichende Alkalität des Gemisches veranlaßt war, stellten wir einen weiteren Versuch an, wo die zugesetzte Laugenmenge variiert und ein p_H bis 9,6 erreicht wurde.

Versuch 30. p_H 3,40. (Milchsäurepuffer). Gesamt-N $5{,}89_8$ mg.

	Anfangswert		24 Std.		28 Std.		48 Std.	
	mg	Proz.	mg	Proz.	mg	Proz.	mg	Proz.
Gesamt-Rest-N . .	0,58	10	2,61	44,3	2,71	45,9	2,77	47

Nach 24stündiger saurer Autolyse alkalisierten wir vier Portionen durch steigende NaOH-Mengen und analysierten sie nach weiteren 3½ und 24 Stunden. Die saure Autolyse kam mit dem N-Wert 2,7 mg zum Stillstand.

In den verschiedenen Portionen wurden an Milligramm N gefunden:

	I. p_H 6,82	II. p_H 6,90	III. p_H 7,95	IV. p_H 9,60
Nach $3^1/_2$ Std. . . .	$3{,}20_6$	3,27	$3{,}25_7$	3,26
„ 24 „ . . .	3,64	3,23	$3{,}18_5$	3,28

Einen Teil der Suspension ließen wir gar nicht erst sauer autolysieren, sondern alkalisierten ihn gleich zu Beginn, um einen etwaigen Unterschied einer alkalischen Autolyse ohne und mit saurer Vorbehandlung finden zu können.

p_H dieser Probe ist 7,56.

Gesamt-Rest-N: zu Anfang 0,58 mg (10 Proz.), nach 28 Stunden 0,85 mg (14,5 Proz.), nach 48 Stunden 0,84 mg (14,3 Proz.).

Die Größe der Autolyse war demnach bei saurer Reaktion 46 Proz., bei alkalischer 14,4 Proz., bei saurer, dann alkalischer 56 Proz.

Eine Weiterspaltung im alkalischen Gebiete ist demnach sicher erfolgt, sie hielt sich aber nur in mäßigen Grenzen. Trotz großer Differenzen in dem p_H der alkalischen Portionen zeigte sich in den N-Werten untereinander kein Unterschied. Somit läßt sich das Fehlen der Fermentwirkung im vorhergehenden Versuche nicht mit einer ungenügenden Alkalisierung erklären.

In dem folgenden Versuche variierten wir die Dauer der sauren Vorbehandlung, da die Möglichkeit einer Abhängigkeit der Fermentwirkung im alkalischen Gebiete von dieser Dauer in Betracht gezogen werden mußte. Doch war in diesem Versuche die Spaltung durchweg noch geringer als im vorhergehenden.

Versuch 31. p_H 3,9 (Milchsäurepuffer). Gesamt-N 12,16₆ mg N.

	Anfangswert		3 Std.		6 Std.		24 Std.		48 Std.	
	mg	Proz.	mg	Proz.	mg	Proz.	mg	Proz.	mg	Proz.
Gesamt-Rest-N	0,88	7,25	2,79	22,9	3,71	30,5	5,33	43,8	5,24	43,1

Nach 3, 6, 24 und 48 Stunden wurden einzelne Portionen alkalisiert, das nun alkalische Autolysat nach stets 24 Stunden untersucht.

Nach 24 Stunden wurden an Milligramm N gefunden:

I. 3 Std. sauer, dann p_H 10,6	II. 6 Std. sauer, dann p_H 10,26	III. 24 Std. sauer, dann p_H 11,3	IV. 48 Std. sauer, dann p_H 10,8
3,36	3,81	5,29	6,17

Das Ergebnis des Versuches war demnach (Gesamt-Rest-N in Prozenten):

	Saure Autolyse	Saure + alkalische Autolyse
	Proz.	Proz.
Nach Verweilen im sauren Medium, 3 Std. . .	22,9	27,6
" " " " " 6 " . .	30,5	31,3
" " " " " 24 " . .	43,8	43,5
" " " " " 48 " . .	43,1	50,7

In diesem Versuche wurde nur mit Natriumhydrat alkalisiert. Ein weiterer Versuch wurde nun in der Weise angestellt, daß wir mit NaOH nur neutralisierten, dann ein Phosphatgemisch mit einem p_H von etwa 9 hinzufügten.

Versuch 32. p_H 4,12 (Milchsäurepuffer). Gesamt-N 10,85 mg.

	Anfangswert		4 Stunden		24 Stunden	
	mg	Proz.	mg	Proz.	mg	Proz.
Gesamt-Rest-N	$0{,}85_7$	7,9	2,92	26,9	5,46	50,3

Nach der Alkalisierung ergaben sich folgende Werte für den Rest-N:

In Portion I. 4 Stunden sauer, dann 24 Stunden p_H 7,82. Rest-N 3,15 mg.

In Portion II. 4 Stunden sauer, dann 24 Stunden p_H 8,32. Rest-N 3,15 mg.

In Portion III. 24 Stunden sauer, dann 24 Stunden p_H 7,92. Rest-N 5,40 mg.

In Portion IV. 24 Stunden sauer, dann 24 Stunden p_H 8,52. Rest-N 5,66 mg.

Das Ergebnis des Versuches war demnach (Gesamt-Rest-N in Prozenten):

	Saure Autolyse	Saure + alkalische Autolyse
Nach 4 Std.	26,9 Proz.	29 Proz. (bei p_H 7,82); 29 Proz. (bei p_H 8,32)
„ 24 „	50,3 „	49,8 Proz. (bei p_H 7,92); 52,2 Proz. (bei p_H 8,57)

Weder nach vierstündiger noch nach 24stündiger saurer Vorbehandlung und Übertragen in ein alkalisches Medium von p_H 7,82 bis 8,52 hat eine irgendwie nennenswerte Weiterspaltung im alkalischen Gebiete stattgefunden.

In den folgenden Versuchen haben wir den Aziditätsgrad bei der Vorbehandlung variiert.

Versuch 33. Kolben A p_H 4,63 (Acetatpuffer); Kolben B p_H 5,01 (Acetatpuffer). Alkalisierung durch NaOH und Phosphatpuffer. Gesamt-N 13,93 mg N.

	Anfangswert		4 Std.		24 Std.	
	mg	Proz.	mg	Proz.	mg	Proz.
Gesamt-Rest-N in A . .	0,63	4,5	2,16	15,5	3,38	24,3
„ „ „ „ B . .	0,63	4,5	$1{,}54_7$	11,1	2,26	16,3

Nach 4- und 24stündiger saurer Autolyse wurde aus A und B je eine Portion alkalisiert (in A p_H 7,3, in B 10,3) und diese Portionen wurden nach weiteren 24 Stunden analysiert.

Gesamt-Rest-N in A nach 4 Stunden Vorbehandlung 2,8 mg (20,8 Proz.); nach 24 Stunden Vorbehandlung 3,45 mg (24,8 Proz.).

Gesamt-Rest-N in B nach 4 Stunden Vorbehandlung 1,6 mg (11,6 Proz.); nach 24 Stunden Vorbehandlung 2,01 mg (14,4 Proz.).

Das Ergebnis des Versuches war demnach (Gesamt-Rest-N in Prozenten):

	Saure Autolyse p_H 4,63	Saure + alkalische Autolyse
Anfangswert	4,5	—
Nach 4 Stunden	15,5	20,8
„ 24 „	24,3	24,8
	Saure Autolyse p_H 5,01	
Anfangswert	4,5	—
Nach 4 Stunden	11,1	11,6
„ 24 „	16,3	14,4

Versuch 34. p_H 5,13 (Acetatpuffer). Gesamt-N 21,0 mg.

	Anfangswert		3 Std.		24 Std.	
	mg	Proz.	mg	Proz.	mg	Proz.
Gesamt-Rest-N	2,18	10,4	4,78	22,8	7,28	34,7

Nach 3- und 24stündiger saurer Autolyse wurden einzelne Portionen wie vorher alkalisiert, 24 Stunden später untersucht.

An Gesamt-Rest-N wurde gefunden:

nach 3stündiger saurer Vorbehandlung mit p_H 10,0: 4,84 mg (23,5 Proz.),
nach 24stündiger saurer Vorbehandlung mit p_H 10,3: 7,96 mg (37,9 Proz.)

Das Ergebnis des Versuches war demnach (Gesamt-Rest-N in Prozenten):

	Saure Autolyse	Saure + alkalische Autolyse
Anfangswert	10,4	—
Nach 3 Stunden	22,8	23,5
„ 24 „	34,7	37,9

Die zwei folgenden Versuche, die mit Milchsäurepuffern verschiedener Azidität angestellt worden sind, zeigen ebenfalls, daß der Aziditätsgrad des sauren Autolysats keinen Einfluß auf die Weiterspaltung nach Übertragung ins alkalische Gebiet ausübt.

Versuch 35. Kolben A p_H 3,01, B p_H 3,96, C p_H 4,53. Gesamt-N 8,16 mg.

Anfangswert des Rest-N 0,46 mg (5,7 Proz.).

Nach 24 Stunden in A 4,01 mg (49,1 Proz.), in B 4,72 mg (57,9 Proz.), in C 3,97 mg (48,6 Proz.).

Nach 24 Stunden wurden alkalisiert: A p_H 8,44, B p_H 8,88, C p_H 8,80.

Nach 5stündigem Verweilen im alkalischen Gebiet wurde analysiert:

In A 5,23 mg (64,1 Proz.), B 6,27 mg (76,8 Proz.), C 5,06 mg (62,0 Proz.) Rest-N.

Hier ist eine Zunahme der Spaltung im alkalischen Gebiete von bzw. 15, 16,9 und 13,4 Proz. zu verzeichnen. Daß wir hier jedoch nicht alle Bedingungen übersehen, zeigt der folgende Versuch, der, obgleich vollkommen gleich angesetzt, diese Spaltungszunahme vermissen ließ.

Versuch 36. Kolben A p_H 3,55, B p_H 3,93, C p_H 4,15.

Anfangswert des Rest-N $0{,}34_6$ mg (5,3 Proz.).

Nach 24 Stunden in A 2,03 mg (31,3 Proz.), in B 2,67 mg (41,1 Proz.), in C 2,22 mg (34,2 Proz.).

Nach 24 Stunden wurde alkalisiert: A p_H 8,32, B p_H 8,52, C p_H 9,09.

Nach 4stündigem Verweilen im alkalischen Gebiet wurde analysiert:

In A 2,10 mg (32,4 Proz.), B 2,54 mg (39,2 Proz.), C 2,12 mg (32,6 Proz.).

Es ist demnach nicht die geringste Zunahme im alkalischen Gebiet zu sehen.

Bei der Beurteilung dieser Vorgänge ist wohl anzunehmen, daß die Säurebehandlung eine etwaige Spaltung im alkalischen Gebiete erst ermöglicht; andererseits kann sie aber auch einen störenden Einfluß auf die Fermenttätigkeit ausüben[1]. Um einen besseren Einblick in die hier obwaltenden Verhältnisse zu gewinnen, haben wir die uns schon gut bekannte Fermenttätigkeit im Optimum (im sauren Gebiete) nach vorübergehender, zeitlich abgestufter alkalischer Reaktion untersucht. Es ließen sich hierbei je nach der Länge der Alkalieinwirkung die verschiedensten Grade der Hemmung bis zur völligen Aufhebung jeglicher fermentativen Wirkung selbst im Optimum nachweisen.

Versuch 37. p_H 4,1 (Milchsäurepuffer).

Gesamt-Rest-N: Anfangs $0{,}85_7$ mg, nach 4 Stunden 2,92 mg, nach 24 Stunden 5,46 mg. Nach 4stündiger saurer Autolyse wurde ein Teil für 24 Stunden eben alkalisch gemacht (gegen Phenolphthalein), dann wieder auf ein p_H von 4,23 zurückgebracht und nach weiteren 24 Stunden der fast unveränderte, nach 4 Stunden erhaltene Wert gefunden: 3,12 mg N.

Versuch 38. p_H 4,63 (Acetatpuffer).

Gesamt-Rest-N: Anfangs 0,63 mg, nach 4 Stunden $2{,}15_6$ mg, nach 24 Stunden 3,38 mg. Zu Beginn der Autolyse wurde eine Portion für 4 Stunden eben alkalisch gemacht (gegen Phenolphthalein), dann wieder auf das frühere p_H gebracht, und nach weiteren 20 Stunden untersucht. Es fanden sich 0,77 mg, also nur unwesentlich mehr, als der Ausgangswert betrug.

Versuch 39. p_H 5,13 (Acetatpuffer).

Gesamt-Rest-N: Anfangs $2{,}17_8$ mg, nach 3 Stunden 4,78 mg, nach 24 Stunden 7,28 mg. Zu Beginn der Autolyse wurde eine Portion für 2 Stunden, eine weitere für ½ Stunde eben alkalisch gemacht (gegen Phenolphthalein), dann auf das frühere p_H gebracht und 24 Stunden später untersucht. Die gefundenen Werte 2,03 und 1,91 mg stimmen mit dem Anfangswert fast überein.

Versuch 40. p_H 4,23 (Milchsäurepuffer). Gesamt-N $21{,}69_6$ mg.

Gesamt-Rest-N: Anfangs 1,45 mg, nach 24 Stunden 6,87 mg. Zu Beginn der Autolyse wurden zwei Portionen durch Zufügen von n/10 NaOH eben alkalisch gemacht (gegen Phenolphthalein) und sofort wieder das frühere p_H hergestellt. 24 Stunden später wurden als Rest-N 3,28 bzw.

[1]) Vgl. hierzu die Untersuchungen von *Hedin*, l. c.

2,89 mg gefunden, also nicht halb so große Werte wie bei der Autolyse ohne Alkalieinwirkung.

Alle diese Versuche zeigen, daß selbst kurz dauernde alkalische Reaktion (p_H um 8) die autolytische Fermentwirkung schädigt bzw. aufhebt. Anhaltspunkte für ein der Trypsingruppe angehörendes Ferment in unseren Autolysengemischen konnten wir bisher nicht finden. Nach unseren bisherigen Untersuchungen, die weitergeführt werden, muß die Autolyse, das Löslichwerden des Organeiweißes, durch ein pepsinähnliches Ferment bedingt sein. Dafür spricht nicht nur die Lage des Optimums, sondern auch die Natur der Spaltprodukte, bei denen die Polypeptidbindung zum größten Teil erhalten blieb.

VI. Bei der Erklärung der beobachteten Erscheinung, daß der Abbau bei 50 bis 60 Proz. des Gesamt-N stehen bleibt, lag es am nächsten, diese auf eine durch die Spaltprodukte hervorgerufene Hemmung zurückzuführen. Um dies zu prüfen, kombinierten wir die Autolyse mit der Dialyse und verfuhren dabei so, daß wir einen Teil der Lebersuspension nicht wie bisher in einem Kolben autolysieren ließen, sondern in einer Dialysierhülse von *Schleicher-Schüll*. Als Außenflüssigkeit benutzten wir regelmäßig dieselbe Pufferlösung, die uns auch zur Herstellung der Pufferlösung der Suspension gedient hat. Sonst wurde alles so gehandhabt wie bisher, nur die Toluolmenge wurde vergrößert; die Lösungen blieben stets keimfrei.

Versuch 41. 19 g Leberbrei + 150 ccm n/20 Milchsäuregemisch p_H 3,88.

A. Innenflüssigkeit 50 ccm der obigen Suspension; Außenflüssigkeit 500 ccm Pufferlösung.

B. Innenflüssigkeit 50 ccm der obigen Suspension, Außenflüssigkeit 1000 ccm Pufferlösung. Die 50 ccm Innenflüssigkeit enthielten 91 mg Gesamt-N.

Nach 24 Stunden wurde in A gefunden: innen 26,5 mg, außen 50,4 mg Rest-N, zusammen 76,9 mg, d. h. 84,5 Proz. des Gesamt-N.

Nach 24 Stunden wurde in B gefunden: innen 31,5 mg, außen 51,7 mg Rest-N, zusammen 83,2 mg, d. h. 91,4 Proz. des Gesamt-N.

Versuch 42. Wie oben. Milchsäurepufferung. p_H 4,10.

A. Innenflüssigkeit 50 ccm Suspension; außen 1000 ccm Pufferlösung.

B. Innenflüssigkeit 50 ccm Suspension; außen 500 ccm Pufferlösung.

Autolyse wie gewöhnlich. Gesamt-N 95,76 mg.

	Anfangswert		4 Std.		24 Std.		48 Std.	
	mg	Proz.	mg	Proz.	mg	Proz.	mg	Proz.
Gesamt-Rest-N . .	8,20	8,6	27,74	29	49,17	51,3	51,80	54,1

Autolyse mit Dialyse nach 24 Stunden, Rest-N:

A. Innen 24,3 mg, außen 56,64 mg; zusammen 80,94 mg = 84,5 Proz.

B. Innen 26,7 mg, außen 55,1 mg; zusammen 81,8 mg = 85,4 Proz.

Eine dritte Portion wurde nach 24stündiger gewöhnlicher Autolyse in eine Dialysierhülse gebracht und nach weiteren 24 Stunden untersucht. Gefunden innen und außen zusammen 62,25 mg Rest-N = 65,0 Proz.

Es ergibt sich demnach, daß nach 24 Stunden die Autolyse ohne Dialyse bis 51,3 Proz., die mit Dialyse 84,5 und 85,4 Proz. des Gesamt-N betrug. Bemerkenswert ist, daß in der dritten Probe die nach 24 Stunden zum Stillstand gekommene Autolyse, in eine Dialysierhülse übertragen, wieder in Gang kam.

Versuch 43. Wie oben (Milchsäurepufferung). p_H 4,18. Gesamt-N 87,0 mg.

Autolyse ohne Dialyse nach 24 Stunden 43,7 mg, d. h. 50,2 Proz. des Gesamt-N.

Autolyse mit Dialyse nach 24 Stunden 62,8 mg, d. h. 72,2 Proz. des Gesamt-N.

Versuch 44. Suspension wie oben (Milchsäurepufferung). p_H 3,9. Gesamt-N 91,28 mg. Autolyse ohne Dialyse:

	Anfangswert		24 Std.		48 Std.	
	mg	Proz.	mg	Proz.	mg	Proz.
Gesamt-Rest-N	8,9	9,8	42,0	46,1	45,08	49,4

Autolyse mit Dialyse: außen 50,75 mg Rest-N, innen 28,73 mg; zusammen 79,48 mg, d. h. 87,1 Proz.

Demnach betrug die Autolyse nach 24 Stunden ohne Dialyse 46,1 Proz., mit Dialyse 87,1 Proz.

Versuch 45. Suspension wie oben (Milchsäurepufferung). p_H 4,6. Gesamt-N 157,5 mg.

Autolyse ohne Dialyse nach 24 Stunden 53,9 mg Rest-N, d. i. 34 Proz. des Gesamt-N.

Autolyse mit Dialyse nach 24 Stunden: außen 56 mg Rest-N, innen 58,43 mg. Zusammen 114,43 mg, d. i. 72 Proz.

Diese Versuche zeigen übereinstimmend, daß durch das Wegdialysieren der Spaltprodukte der Grad der Autolyse nennenswert erhöht wird. Obgleich die Dialyse noch nicht zu Ende geführt war und die angewandte Technik der Dialyse wohl vervollkommnet werden kann, haben wir nach 24 Stunden Spaltungswerte von 72 bis 91,4 Proz. gefunden, gegen 50 Proz. bei der gewöhnlichen Autolyse. Die Annahme, daß die Spaltprodukte hemmend auf den Gang der Autolyse wirken, erscheint demnach wohlbegründet.

Zusammenfassung.

Die Autolyse an Lebern von Meerschweinchen wurde studiert und die große Abhängigkeit des Grades der Autolyse von der Wasserstoffionenkonzentration des Mediums in Übereinstimmung mit den

Befunden anderer Autoren festgestellt. Es besteht ein Optimum der Wirkung bei stark saurer Reaktion bei etwa p_H 3,6 bis 3,8. Diese Lage des Optimums konnte sowohl bei Milchsäure- und Weinsäuregemischen als Pufferlösungen wie auch bei Acetatgemisch gefunden werden. Bei Phthalatpuffern war das Optimum etwas nach der alkalischen Seite verschoben (p_H etwa 4,2).

Eine gewisse fördernde Wirkung des Milchsäuregemisches im optimalen Gebiete ist zu beobachten, dann sinkt die Autolyse steil, während bei Weinsäurepufferung das Absinken des Autolysengrades allmählicher vor sich geht, so daß im nicht optimalen Gebiete die Autolyse beim Weinsäuregemisch schneller verläuft als beim Milchsäuregemisch.

Die Abbauprodukte im Autolysat enthalten den Stickstoff zum allergrößten Teile in peptidartiger Bindung. Die Menge der freien Aminosäuren, des Harnstoffs und des Ammoniaks tritt dagegen ganz zurück.

Dieser Befund wie auch die Lage des Optimums im sauren Gebiete sprechen dafür, daß wir es bei der Autolyse mit einem der Pepsingruppe angehörenden Ferment zu tun haben. Anhaltspunkte für ein tryptisches Ferment konnten in der vorhergehenden Untersuchung nicht gefunden werden. Schon kurz dauernde Einwirkung alkalischer Reaktion (von etwa p_H 8 an) hebt die Wirkung des autolytischen Ferments (oder der autolytischen Fermente) auf.

Die Autolyse machte in allen mitgeteilten Versuchen bei etwa 50 Proz. Abbau (auf Gesamt-N der Suspension bezogen) halt. Leitete man jedoch die Versuche so, daß die Spaltprodukte wegdialysieren konnten, so ging die Spaltung weiter und erreichte, trotz unvollständiger Dialyse, Werte bis 90 Proz.

Gelatine-Kapillaren.

Ein Beitrag zur Modelluntersuchungsmethode biologischer Erscheinungen.

Von

N. A. Beloff †.

(Aus dem physiologischen Laboratorium des Instituts zur Erforschung des Gehirns und der psychischen Tätigkeit in Petrograd.)

(Eingegangen am 27. April 1923.)

Bis zur allerletzten Zeit ging man bei Erforschung aller Lebenserscheinungen bloß auf analytischem Wege vor. Allerdings wurden hin und wieder Versuche gemacht, die biologischen Erscheinungen durch reine physikalisch-chemische Beispiele zu erklären. Besonders bemerkenswert in dieser Richtung wird wohl das bekannte Protoplasmamodell *O. Bütschlis* gewesen sein, aber alles in allem, weiter als zu Analogien kam es in allen diesen Fällen nicht. Einen Fortschritt in dieser Beziehung bedeuteten also die Untersuchungen *M. Fischers*, der nicht bloß Analogien suchte, sondern mit Hilfe von Modellen zur Ergründung biologischer Probleme herantrat. Wurden früher alle Modelle als wissenschaftliche Spielereien von Vertretern der vitalistischen Schule angesehen, so mußte diese Ansicht aufgegeben werden, nachdem von *M. Fischer* und *Strietmann* zur Genüge bewiesen worden war, welche Schlüsse man aus diesen Modellen ziehen kann.

Eine Untersuchungsmethodik mit Hilfe von Modellen hat sich nun das volle Bürgerrecht erworben, jedoch handelt es sich nicht bloß um eine neue Methodik, sondern um eine neue Richtung. An die biologische Erscheinung tritt man heran, nicht bloß um sie zu analysieren, sondern man ist bestrebt, die Lebenserscheinung selbst nachzubilden. Dem dient ein Modell. Vorerst ist es eine sehr entfernte Wiedergabe, aber die weiteren Versuche ergeben eine größere Annäherung, bis es zuletzt gelingt, an das Ideal — das Leben selbst — möglichst nahe heranzutreten. Diese Richtung in der Biologie muß als die synthetische bezeichnet werden. Es ist eine vollkommene Analogie zur Chemie, wo man ja auch vom Analysieren ausging, um schließlich zur Synthese zu gelangen. So sprach man ja früher in der Biochemie beim Ana-

lysieren des tierischen Körpers von der Menge des enthaltenen Leimes, Fettes, Kalkes usw. — heute aber begnügt man sich nicht mehr damit allein. So ist es auch in der Biologie: die ersten Versuche werden ja womöglich ziemlich ungeschickt sein, aber im weiteren wird es zu ihrer Verfeinerung kommen. Deshalb liegt das Verdienst *Fischers* nicht bloß darin, daß er von kolloiden Stoffen in biologischen Erscheinungen sprach — dies wurde auch vor ihm von vielen deutschen Forschern hervorgehoben —, aber sein Verdienst liegt darin, daß er ein neues Prinzip aufstellte: ein Modell der Lebenserscheinung.

Eine solche Modellmethode habe ich beim Schreiben dieser Zeilen im Sinne. Es handelt sich um ein Modell der Gefäßkapillaren — wie aus dem oben Gesagten folgt, um ein der Wirklichkeit sich sehr näherndes Modell aus Gelatine.

Bevor ich aber nun über die Methodik selbst berichte, will ich einige Fragen berühren, die dabei zu berücksichtigen sind. Bekanntlich hat man bei allen Versuchen, bei denen man mit Quellungserscheinungen der Gelatine zu tun hat, damit zu rechnen, daß ein gewisser Teil derselben peptisiert werden kann; je nach der Flüssigkeit ist diese Erscheinung stärker oder schwächer ausgeprägt. Bei allen Untersuchungsmethoden, so z. B. nach der Methode von *Hofmeister*, wo Gelatinestückchen in eine Flüssigkeit gebracht wurden, kam es schließlich zu einer partiellen Auflösung der Gelatine, und so wurde aus einer umgebenden Elektrolytlösung schließlich ein Sol der Gelatine, wobei die Konzentration der gelösten Gelatine beständig zunahm. Untersucht man also zu Beginn des Experimentes den Einfluß einer Elektrolytlösung auf ein Gel, so hat man zum Schluß des Versuches mit einer Einwirkung des Sols auf das Gel desselben Stoffes zu tun. Also von Genauigkeit kann bei einem solchen Verfahren nicht die Rede sein. Um dieses Übel zu beseitigen, muß die Elektrolytlösung beständig erneuert werden, was dadurch erzielt wird, daß man sie beständig abfließen läßt. Um dieses zu erlangen, benutzte ich eine Methode, ähnlich wie sie von Prof. *N. Krawkoff* bei Untersuchung von isolierten Kapillaren benutzt wird — ich ließ einen Strom der Elektrolytlösung durch ein Gelatineröhrchen fließen. Es ist klar, daß der Kanal des Röhrchens nicht zu eng sein darf, da beim langsamen Durchströmen das Sol dennoch mit dem Gel in Berührung bleibt; wählt man aber den Kanal breit genug, so fließt die Flüssigkeit schnell ab, und auf das Gel wirkt beständig eine Elektrolytlösung. Es lassen sich die Eigenschaften des Gels genau feststellen, indem man das Gewicht des Röhrchens, die Durchströmungsgeschwindigkeit der Flüssigkeit, ihre Bestandteile und die Zeit bis zur vollkommenen Auflösung bzw. bis zum vollkommenen Verschluß des Kanals infolge der Quellung des Gels bestimmt. Diese Umstände führten uns zu folgender Methodik:

Es wird ein Glastrichter mit einem verlängerten Abflußrohr genommen, dessen Ende mit einem Korken verschlossen ist, durch den eine gut geschliffene dicke Nadel gestochen wird. Da es darauf ankommt, daß die Nadel möglichst genau die Mitte des Röhrchens einnimmt, tut man gut, den Korken mit der durchgezogenen Nadel auf den Boden eines Glases zu stellen und auf ihn vorsichtig das Röhrchen heraufzudrücken, bis die gewünschte Stellung erreicht wird; das Ende der Nadel muß in den Trichter hineinragen. Nun wird in die Trichteröffnung heiße flüssige Gelatinelösung erwünschter Konzentration gegossen, bis das gesuchte Niveau am Röhrchen erreicht ist — ungefähr ½ bis ¾ seiner Länge. Ins Glas gießt man kaltes Wasser, nach etwa 1 Minute ist die Gelatine schon erstarrt und der Trichter kann aus dem Wasser genommen werden. Man läßt ihn mit der Trichteröffnung nach unten 15 Minuten stehen, darauf wird der Pfropfen mit der Nadel leicht gedreht, bis die Gelatine von der Nadel sich ablöst; hierauf werden Korken und Nadel herausgezogen. Nun hat man ein Gelatineröhrchen mit einem engen Lumen, das im Glasrohre eingeschlossen ist. Indem man die Nadel dicker oder dünner wählt, erlangt man ein Röhrchen mit weiterem oder engerem Kanal, dementsprechend fließt die Flüssigkeit, die in den Trichter gegossen wird und deren Einfluß auf die Gelatine man untersuchen will, schneller — im Strahl — oder langsamer — tropfenweise — aus der unteren Öffnung heraus. Wie schon gesagt, werden sich für physikalisch-chemische Untersuchungen, wo Gelatinequellung und Lösung untersucht werden, Röhrchen mit breiterem Kanal, für physiologische Modelluntersuchungen dagegen diejenigen mit engerem Kanal mehr eignen.

Nachstehende Tabelle möge die Erscheinungen illustrieren, die bei Durchspülung eines beschriebenen Kapillarröhrchens mit einer schwachen (2proz.) Essigsäurelösung auftreten; da dieselbe stärkere Quellungserscheinungen und verhältnismäßig schwächere Auflösung der Gelatine hervorruft, wird ein Röhrchen mit engerem Kanal gewählt.

Zahl der Tropfen	Zeitabstände in Sekunden, in denen die Tropfen abgezählt worden sind	Zahl der Tropfen	Zeitabstände in Sekunden, in denen die Tropfen abgezählt worden sind
7	10	3	20
3	10	1	10
3	10	1	10
5	20	1	10
5	20	3	40
2	10	1	20
3	10[1]	1	30
2	10	0	—
3	20		

[1]) Das Röhrchen wird durchgeblasen und darauf wird der Versuch fortgesetzt.

Will man in dieser Tabelle die Zahl der Tropfen in bestimmten gleichen Zeitabständen abzählen, so ergibt sich die Zahl der Tropfen auf jede 10 Sekunden folgendermaßen:

Vor dem Durchblasen: 7, 3, 3, 2½, 2½, 2½, 2½, 2.

Nach dem Durchblasen: 3, 2, 1½, 1½, 1½, 1½, 1, 1, 1, ¾, ¾, ¾, ¾, ½, ½, ½, ½, ½, ⅓, ⅓, ⅓, worauf das Ausfließen aufhörte.

Das Durchblasen diente, um festzustellen, daß keine Fremdkörper im Kanal vorhanden sind und daß die Verengung desselben bloß auf die Quellung allein zu beziehen ist.

Diese Tabelle illustriert vollkommen die Arbeitsmethodik mit den Gelatinekapillaren. Man muß aber einen Umstand beachten. Da das Gelatineröhrchen in eine starke Glashülle eingeschlossen ist, hat es nicht die Möglichkeit, bei der Quellung sich zu erweitern, darum geht die Quellung bloß in einer Richtung — nach dem Lumen des Kanals. Bei Gelatinekapillaren, die nicht in Glasröhren eingeschlossen sind und keine übermäßig dicken Wände haben, muß es infolge der Quellung des Gels nicht zu einer Verengerung, sondern zu einer Erweiterung des Lumens kommen. In meinem Laboratorium wurden von *M. Mandelstamm* mittels dieser Methodik Untersuchungen ausgeführt über den Einfluß von verschiedenen Elektrolyten auf diese Röhrchen[1]), und es ließ sich auch feststellen, daß der erwähnte Umstand tatsächlich bestätigt wird. Dieses beweist, wie sich nun die vorgeschlagene Methode modifizieren läßt. Die Modellmethode beantwortet nicht nur die gestellten Fragen, sondern bringt neue mit sich, um sie gleich zu lösen. Sie selbst aber verlangt noch vieles, um vervollkommnet zu werden: 1. es müssen freie Kapillaren geschaffen werden außer denen, die im Glasrohre eingeschlossen sind; 2. die Kapillaren müssen mit Membranen versehen werden; 3. außer Gelatine müssen auch andere Kolloide benutzt werden. Es ist also noch viel Arbeit nötig, um das Modell denjenigen Kapillaren möglichst nahe zu bringen, die wir als „lebendige" bezeichnen. Alle diese Fragen sind von mir und meinen Mitarbeitern in Angriff genommen. Aber auch das wenige, das von uns bei gegenwärtigen schweren Arbeitsbedingungen ausgeführt wurde, eröffnet ein weites Arbeitsfeld für diese Methodik, und viele interessante Fragen harren durch sie ihrer Lösung. Wir haben uns vorerst folgende Arbeitsziele gestellt:

1. Adrenalin wirkt verengernd auf die Kapillaren, jedoch erweitert es diese in den Lungen und im Gehirn und übt fast keine Wirkung auf die Kapillaren des Herzens aus (manche Autoren nehmen an, daß es auch diese erweitert). — Läßt sich diese verschiedene Wirkung nicht dadurch erklären, daß das Adrenalin auf jene Kapillaren, die

[1]) Die Arbeit erscheint in nächster Zeit.

in festen Geweben (Haut, Muskeln, Serosa usw.) gelagert sind, wie auf Gelatinekapillaren im Glasrohre, und auf die Kapillaren, die in weichen Geweben (Lunge, Gehirn) gelegen sind, wie auf freie Gelatinekapillaren wirkt?

2. Lassen sich nicht die Erscheinungen an den Kapillaren von isolierten bzw. sogar getrockneten Organen erklären durch die Eigenschaften ihrer kolloiden Bestandteile, die ihre Struktur noch nicht verloren haben, und nicht durch andere vitalistische Momente?

3. Stellen nicht die Einflüsse des Nervensystems auf die Kapillaren bloß indirekte Erscheinungen dar, die ausgelöst werden, indem durch die Nervenendigungen ein elektrisches Feld geschaffen wird, welches die Eigenschaften der Kolloide der Kapillarenwände und der strömenden Flüssigkeit des Blutes ändern würde?

Damit sollen noch nicht alle Fragen erschöpft werden, aber dieses sind unsere nächsten Ziele, an denen ich und meine Mitarbeiter arbeiten. Ich glaube, das Angeführte spricht genügend für die vorgeschlagene Methodik. Es soll ja nicht damit gesagt sein, daß ich, indem ich den synthetischen Weg in der Biologie vorschlage, die Bedeutung der biologischen Analyse schmälern wolle: im Gegenteil, beide Wege, die zu ein und demselben Ziele führen, müssen parallel verlaufen, bloß soll der Forscher in jedem Falle den entsprechenden Weg zu finden wissen.

Einige Untersuchungen an Gelatine-Kapillaren.

Vorläufige Mitteilung.

Von

Maximilian Mandelstamm.

(Aus dem physiologischen Laboratorium des Instituts zur Erforschung des Gehirns und der psychischen Tätigkeit in Petrograd.)

(Eingegangen am 27. April 1923.)

In einem kleinen Artikel, betitelt „Gelatinekapillaren“, teilte kürzlich Prof. *N. A. Beloff* eine neue Methode mit, die er für die Untersuchungen der Quellungserscheinungen vorschlägt. Wenn man nämlich durch ein Gelatineröhrchen, das in einem Glasröhrchen eingeschlossen ist, verschiedene Flüssigkeiten hindurchläßt, so quellen die Wände des Röhrchens an, und die pro Zeiteinheit ausströmende Flüssigkeitsmenge wird geringer; je stärker die Quellung verläuft, desto weniger Flüssigkeit strömt durch das Röhrchen hindurch. Der Quellungsgrad hängt von den Eigenschaften der durchströmenden Flüssigkeit ab.

Prof. *Beloff* schlug mir, als einem seiner nächsten Mitarbeiter, vor, diese Methode zu prüfen und einige Untersuchungen auszuführen. Ich habe nun eine recht große Anzahl von Versuchen angestellt, wobei ich die aufeinanderfolgenden Wirkungen verschiedener Lösungen auf diese Röhrchen untersuchte. Wie man auch von Anfang an erwarten konnte, ließen sich die Quellungs- und Entquellungserscheinungen sehr gut dabei verfolgen, und man konnte einen verschiedenen Effekt gewinnen, je nachdem die Reihenfolge dieser Flüssigkeiten angeordnet wurde. Diese Untersuchungen können noch lange nicht als abgeschlossen gelten, ich arbeite auch gegenwärtig weiter auf diesem Gebiet, aber dennoch möchte ich hier über einige Versuche berichten, die die Methode demonstrieren und gewissermaßen die vorgenommene Arbeit erläutern.

Vorerst einige Worte über die Methodik. Die Röhrchen wurden genau nach der Originalvorschrift zubereitet und in frischem Zustande verwendet. Somit arbeitet man in diesen Versuchen nicht mit getrockneten, sondern mit frischen Gallerten. Nun muß ich hier gleich auf einen Umstand hinweisen, der sehr oft den ganzen Versuch verderben kann: Beim Herausziehen der Nadel aus der erstarrten Gelatine bilden sich in der letzteren sehr oft Risse, und die Wände der Gelatineröhrchen werden uneben. Dadurch verläuft die Quellung des Röhrchens nicht gleichmäßig, und es kann vorkommen, daß ein kleiner herabhängender

Gelatinefetzen beim Aufquellen einen partiellen Verschluß des Kanals herbeiführt. Dieses trifft öfter zu, wenn man mit minder konzentrierter Gelatine arbeitet, bei einer 20proz. Gelatinelösung läßt sich dieser Umstand bei einem gewissen Grade von Geschicklichkeit und Vorsicht vermeiden. Alle Lösungen müssen gut filtriert sein, damit sich im Kanal keine verschließenden Niederschläge bilden.

Das Abzählen der herausströmenden Flüssigkeit wurde in solcher Weise vorgenommen, daß dieselbe in Zeiträumen von 5 Minuten gesammelt und gemessen wurde. In den weiter unten angeführten Tabellen entsprechen die unter der Rubrik „Zeiträume“ angeführten römischen Zahlen diesen Zeiträumen, wobei I den ersten 5 Minuten entspricht, II den zweiten 5 Minuten (6 bis 10 Minuten), III den dritten 5 Minuten (11 bis 15 Minuten) usw.

Je stärker die Quellung war, desto weniger Flüssigkeit konnte in dieser Zeit gesammelt werden und bei noch stärkerer Quellung, die zum Verschluß des Kanals führte, floß überhaupt keine Flüssigkeit mehr hindurch. Ebenso offenbarte sich auch der Entquellungsprozeß, indem eine Abnahme der Quellung durch das Größerwerden der ausströmenden Flüssigkeitsquantität verzeichnet wurde. Weiter unten angeführte Versuche veranschaulichen dieses.

Es erwies sich vorerst, daß das Gelatineröhrchen sein Lumen verringert unter dem Einfluß aller Lösungen, die ein Quellen der Gelatine hervorrufen. Am stärksten (bzw. am schnellsten) geschah es unter dem Einfluß von Laugen- und Säurelösungen; schwächer (langsamer) wirkten die Salzlösungen. Bei letzteren schien die Konzentration eine Rolle zu spielen: So schienen konzentriertere (14- bis 16proz.) NaCl-Lösungen eine mindere Quellung hervorzurufen als die schwächeren (3proz.). Dieser Umstand soll im weiteren genauer geprüft werden. Eine gesättigte NaCl-Lösung erzeugte ein Auflösen des Röhrchens ohne vorherige Lumenverringerung.

Ich will nun einige Versuche anführen, die die Methode erläutern und einige gewonnene Resultate andeuten sollen. Die Versuchsanordnung war dabei folgende: in den Trichter wurde bis zu einer gewissen Marke die Flüssigkeit gegossen, deren Wirkung untersucht werden sollte. Die abfließende Menge wurde von Zeit zu Zeit durch vorsichtiges Zugießen frischer Portionen ersetzt, um größere Schwankungen zu vermeiden, die dabei durch den verschiedenen Druck der Flüssigkeitssäule bedingt werden könnten; somit floß die Flüssigkeit unter einigermaßen gleichem Druck nach unten ab. Sollte nun weiter der Einfluß einer anderen Flüssigkeit untersucht werden, so wurde die erste schnell abgegossen und durch die zweite ersetzt. Da der Trichter von verhältnismäßig großer Kapazität ist (etwa 20 bis 25 ccm), so spielen die an der Wand übrigbleibenden Spuren der ersten Flüssig-

keit keine große Rolle — jedoch muß man beim Beurteilen der Resultate diesen Umstand im Auge haben.

In den Tabellen, die angeführt werden, sind die verschiedenen Flüssigkeiten in vertikalen Reihen angeordnet in der Reihenfolge, wie sie im Versuch durchgelassen wurden: in Tabelle I wurden z. B. hintereinander Aqua fontana (im Laufe von 45 Minuten), 3proz. NaCl-Lösung (15 Minuten) und 16proz. NaCl-Lösung (25 Minuten) hindurchgelassen. Die Zeiträume werden für alle Flüssigkeiten an einer gesamten Spalte abgelesen, jedoch würde die Ziffer I für die zweite Reihe eigentlich einer X entsprechen, da die Durchströmung von 3proz. NaCl-Lösung nach 45 Minuten erst begonnen hat, ebenso würde die II einer XI gleich sein, d. h. 51 bis 55 Minuten im Experiment entsprechen, usw.; für die dritte Reihe würde I bis XIII und 61 bis 65 Minuten entsprechen usf.

Tabelle I.

Wechselwirkungen von Wasser und Salzlösungen verschiedener Konzentrationen.

Zeiträume	Flüssigkeitsmengen		
	Aq. fontana	3 proz. NaCl	16 proz. NaCl
I	56 ccm	24 ccm	23 ccm
II	45 „	20 „	27 „
III	39 „	18 „	38 „
VI	34 „	—	51 „
V	33 „	—	58 „
VI	28 „	—	—
VII	26 „	—	—
VIII	25 „	—	—
IX	23 „	—	—

In diesem Versuch findet eine gleichmäßige Quellung des Röhrchens unter dem Einfluß von Wasser statt, dieselbe wird bei einem bestimmten Grade langsamer; durch das folgende Durchströmen einer 3proz. NaCl-Lösung wird die Quellung etwas beschleunigt, die darauf folgende 16proz. NaCl-Lösung ruft einen Rückgang der Quellung hervor und erweitert den Kanal bis über die ursprüngliche Weite.

Tabelle II.

Wechselwirkungen von Salzlösungen verschiedener Konzentration.

Zeiträume	Flüssigkeitsmengen	
	3 proz. NaCl	14 proz. NaCl
I	58 ccm	38 ccm
II	48 „	49 „
III	43 „	58 „
IV	39 „	55 „
V	38 „	53 „
VI	37 „	52 „

Quellung des Röhrchens unter dem Einfluß von 3proz. NaCl-Lösung bis zu einem bestimmten Grade, wo der Vorgang langsamer wird und fast aufhört; ein folgendes Hindurchlassen von 14proz. NaCl-Lösung führt zur Erweiterung des Kanals bis zu ursprünglicher Weite, verringert ihn aber darauf wieder.

Tabelle III.
Wechselwirkungen von Salzlösungen verschiedener Konzentration.

Zeiträume	Flüssigkeitsmengen			
	3proz. Na_2SO_4	3proz. NaCl	3proz. Na_2SO_4	14proz. NaCl
I	100 ccm	86 ccm	73 ccm	76 ccm
II	95 „	82 „	71 „	90 „
III	88 „	77 „	71 „	102 „
IV	86 „	74 „	—	—

Das Röhrchen ist kürzer als diejenigen, die in den anderen Versuchen verwandt wurden, dadurch ist die Menge der ausströmenden Flüssigkeit größer.

Langsames Quellen unter dem Einfluß von 3proz. Na_2SO_4-Lösung; unter dem Einfluß von 3proz. NaCl wird dasselbe etwas beschleunigt, aber folgende 3proz. Na_2SO_4-Lösung führt wieder zu einer Verlangsamerung. Unter dem Einfluß von 14proz. NaCl wird die Quellung wieder geringer, und der Kanal erweitert sich bis zur ursprünglichen Weite.

Tabelle IV. Wechselwirkungen von Säure- und Salzlösungen.

Zeiträume	Flüssigkeitsmengen		
	3proz. NaCl	3proz. HCl	3proz. NaCl
I	50 ccm	24 ccm	13 ccm
II	42 „	14 „	16 „
III	38 „	6 „	17 „
IV	36 „	—	18 „
V	35 „	—	16 „

Quellung unter dem Einfluß von 3proz. NaCl-Lösung, die bei einem bestimmten Grade fast aufhört; folgende Einwirkung von 3proz. Salzsäurelösung ruft ein starkes Anquellen und starke Lumenverringerung hervor, dieselben werden zum Teil durch folgende 3proz. NaCl-Lösung wieder aufgehoben.

Tabelle V. Wechselwirkungen von Säure- und Salzlösungen.

Zeiträume	Flüssigkeitsmengen		
	3proz. Na_2SO_4	3proz. HCl	3proz. NaCl
I	54 ccm	25 ccm	10 ccm
II	48 „	14 „	16 „
III	44 „	7 „	20 „
IV	—	5 „	24 „
V	—	—	22 „
VI	—	—	18 „

Langsames Quellen unter dem Einfluß von 3proz. Na_2SO_4-Lösung. Durch die folgende Salzsäure wird das Anquellen sehr beschleunigt: 3proz. NaCl-Lösung, die darauf durchgelassen wird, bewirkt vorerst einen Rückgang desselben, später aber findet wieder ein Anquellen statt — dieses Mal unter dem Einfluß der Salzlösung.

Tabelle VI.

Wechselwirkungen von Laugen- und Säurelösungen.

Zeiträume	Flüssigkeitsmengen			
	2proz. NaOH	3proz. HCl	3proz. NaCl	2proz. NaOH
I	30 ccm	9 ccm	7 ccm	5 ccm
II	14 „	3 „	11 „	0,5 „
III	—	—	—	0 „ [1])

2proz. NaOH-Lösung ruft eine starke Quellung hervor, die auch durch die folgende Salzsäure fortgesetzt wird; 3proz. NaCl-Lösung, die nach der Salzsäure durchgelassen wird, wirkt der Quellung entgegen und führt zu einer Erweiterung des Kanals; Natronlauge nach der Salzlösung durchgelassen, führt durch starkes Anquellen des Röhrchens zum Verschluß des Kanals.

In dieser Art wurden auch die anderen Untersuchungen ausgeführt; wie ich schon sagte, sind sie noch nicht abgeschlossen, da noch eine Reihe von Fragen zu klären ist. Aber einige Schlußfolgerungen lassen sich aus diesen Untersuchungen schon andeuten. So scheint z. B. bei der angeführten Versuchsordnung auch der osmotische Druck der Flüssigkeit in manchen Fällen eine Rolle zu spielen. Dieses äußert sich bei nachfolgender Wirkung zweier Salzlösungen, von denen die zweite von größerer Konzentration ist. Daß es sich hierbei nicht um eine Solvation der Gelatinewand allein handelt, beweist der Umstand, daß das Röhrchen auch unter dem Einfluß dieser konzentrierten Lösungen allein zu quellen beginnt, wie ich es mehrmals feststellen konnte. Da die Röhrchen frische Gallerten darstellen, so ziehen sie beim Quellen vielleicht mehr Salz an.

Wie es aber scheint, handelt es sich hier nicht um rein osmotische Wirkungen. Ich habe nämlich auch einige Versuche angestellt, bei denen die Gelatinemasse auf einer 3proz. NaCl-Lösung zubereitet wurde, jedoch reagierte ein derartiges Röhrchen auf die verschiedenen Lösungen ebenso wie die sonst auf Wasser zubereiteten. In keinem Falle, auch beim Durchlassen einer 16proz. NaCl-Lösung, konnte eine primäre Lumenerweiterung festgestellt werden, was ja zu erwarten wäre, wenn das Wasser des Gelatineröhrchens den osmotischen Verhältnissen

[1]) Kein Ausströmen der Flüssigkeit.

folgen würde, jedoch stellte sich immer eine Erweiterung des Kanals ein, wenn eine konzentriertere Lösung einer 3proz. NaCl-Lösung folgte.

Der entquellende Einfluß einer Salzlösung der Säure gegenüber läßt sich, wie aus den angeführten Tabellen zu ersehen ist, mit dieser Methode sehr gut feststellen. Da ich aber mit starken Konzentrationen gearbeitet habe, so läßt sich vorerst nicht sagen, in welchen Grenzen dieser Vorgang umkehrbar ist: dieses soll mit Hilfe von schwächeren Verdünnungen, die genauer gegeneinander abgestimmt sind, festgestellt werden.

Was die Wechselwirkungen von Säuren und Laugen anbetrifft, so kommt es, wenn man mit stärkeren Konzentrationen arbeitet (2- bis 3proz.), nicht zu einer Gegenwirkung, sondern die Quellung wird weiter fortgesetzt; es ist dabei einerlei, ob zuerst eine Säure und nachher eine Lauge (NaOH) durchgeleitet wird oder umgekehrt. Auch hier sind weitere Versuche mit schwächeren Konzentrationen nötig, die feiner abgestimmt sind.

Ich möchte noch bemerken, daß in einigen Versuchen die Gelatinemasse in 2proz. Salzsäure bzw. $\frac{1}{2}$proz. NaOH-Lösung gelöst wurde und entsprechende Röhrchen bereitet wurden. Es reagierten auch diese ähnlich wie die auf Wasser bereiteten: Bei der ersten Durchleitung von Salzlösung konnte keine primäre Entquellung bzw. Lumenerweiterung festgestellt werden — jedoch traten entsprechende Erscheinungen auf bei weiteren, einander folgenden Durchleitungen beschriebener Flüssigkeiten. Es ist eine Erscheinung, die ähnlich ist dem Ausbleiben einer primären Entquellung bei den in Salzlösung bereiteten Röhrchen, von denen soeben die Rede war.

Wie dieser Umstand zu deuten wäre, kann ich vorerst auf Grund vorliegender Tatsachen noch nicht sagen — es sind weitere Untersuchungen nötig. Vorerst könnte man vielleicht unterscheiden zwischen einem „Konstruktionswasser", mit dem die Gelatinemasse bereitet wurde, und einem „Quellungswasser", das bei folgenden Vorgängen aufgenommen wurde. Man könnte dann sagen, daß ersteres besonders festgehalten werde und nur bei gleichzeitiger Destruktion der Gelatinemasse freigegeben werde, wie es z. B. unter dem Einfluß von gesättigter NaCl-Lösung geschieht, wo das Röhrchen im Laufe von 15 bis 20 Minuten vollständig von innen heraus aufgelöst wird.

Das wären ungefähr die Tatsachen, auf die ich im Laufe meiner Versuche gestoßen bin; letztere, wie schon gesagt, sind noch lange nicht abgeschlossen. Spricht man nun aber von der Methode, so scheint mir, daß sich dieselbe vollkommen bewährt. Allerdings wird man immer, außer an die Erscheinungen der Quellung, auch an die Erscheinungen infolge osmotischer Druckdifferenzen und an die Erscheinungen der Oberflächenspannung denken müssen, wenn man die endgültigen

Resultate beurteilen will. Was speziell die Oberflächenspannung anbelangt, so tritt sie besonders beim Hindurchlassen von Laugen hervor, wobei die Reibungserscheinungen der Grenzflächen am ausgeprägtesten sind. Hier kann es so weit kommen, daß die Flüssigkeit nicht mehr ausströmt, obwohl der Kanal noch nicht ganz verschlossen ist. Solche Fälle lassen sich leicht beim Durchblasen des Röhrchens feststellen.

Damit könnte eigentlich diese Mitteilung geschlossen werden, aber ich möchte vorher noch einige Worte über eine Erscheinung berichten, auf die ich bei den vorgenommenen Untersuchungen gestoßen bin. Es handelt sich nämlich um die Rolle, die der Glasumhüllung bei der Quellung der Gelatineröhrchen zukommt. Ich habe einige Versuche mit sehr kleinen Röhrchen angestellt, die ich aus Gelatinekapseln anfertigte — sie quollen in allen bezeichneten Flüssigkeiten an, indem ihr Lumen einigemal größer wurde. Schloß ich aber dieselben Röhrchen in einen sie fest umschließenden Glas- oder Metallzylinder, so trat bei ihrer Quellung eine Verengerung des Lumens ein, indem sich ihre aufquellenden Wände in Falten legten. Daraus könnte man annehmen, daß freie (ohne Umhüllung) Röhrchen bei der Quellung sich erweitern, während eingeschlossene ihr Lumen verengern, und es ist interessant, wie ein und derselbe Quellungsprozeß, je nach den räumlichen Bedingungen, zu verschiedenen Bildern führen kann.

Die schweren Bedingungen, unter denen ich zu arbeiten hatte, gestatteten mir nicht, die Untersuchungen mit exakteren Methoden auszuführen, und ich will auch gleich bemerken, daß ich auf Grund der angeführten Versuche noch keine endgültigen Schlüsse zu ziehen beabsichtige.

Über die Meiostagminreaktion.

Von

Helmut Maiweg† und Fritz Eichholtz.

(Aus dem pharmakologischen Institut der Universität Rostock.)

(Eingegangen am 25. Juni 1923.)

Die Frage, ob es möglich ist, Immunreaktionen mit physikalischen Methoden zu erfassen, taucht immer wieder auf. Denn obgleich diese Immunreaktionen chemisch angesehen wie ein vielfach verschlungenes Knäuel von Teilprozessen sich darbieten, und obgleich sich mit einer physikalischen Methode nur ein isoliertes und vielleicht belangloses Bruchstück erfassen läßt, fordert die Prägnanz der physikalischen Meßverfahren doch immer wieder zu neuen Versuchen heraus.

Ascoli und *Izar*[1]) haben Arbeiten veröffentlicht, durch die nachgewiesen werden sollte, daß bei diesen Reaktionen Veränderungen der Oberflächenspannung auftreten und glauben so zu einer Diagnose von Infektionskrankheiten und bösartigen Geschwülsten zu gelangen. Was die Meiostagminreaktion bei Carcinom anbetrifft, so ist es besonders das Verdienst von *Izar*[2]), nachgewiesen zu haben, daß in dieser Reaktion die Tatsache zum Ausdruck kommt, daß Tumorseren mit gewissen Lipoiden und Fettsäuren in besonderer Weise reagieren. *Izar* hat gezeigt, daß Emulsionen von Linol- und Ricinolsäure die Stelle der Antigene vertreten können.

Auf dem Gebiete der Infektionskrankheiten dagegen hat sich die Methode keinen Eingang zu verschaffen gewußt, vielleicht aus dem Grunde, weil die Stalagmometermethode in der Hand anderer Untersucher keine überzeugenden Resultate lieferte [so waren neuerdings Versuche von *Gouwens*[3]) völlig negativ], vielleicht auch, weil sie von einer Reihe von scheinbar unbedeutenden Nebenumständen

[1]) *Ascoli* und *Izar G.*, Münch. med. Wochenschr. 1910, Heft 2, S. 62.
[2]) *G. Izar*, Klin. Wochenschr. 1923, Nr. 14, S. 641.
[3]) *W. E. Gouwens*, Journ. of Infect. Disease **32**, No. 3, S. 237, 1922.

abhängig und daher sehr empfindlich ist. Immerhin ist eine prinzipielle Ablehung der Ergebnisse nicht erfolgt.

Nun schien die Frage der Meiostagminreaktion sehr nahe berührt zu werden, als der eine von uns nachwies[1]), daß zwischen Eiweißkörpern und Lipoiden ein physikalischer Antagonismus besteht, der sich in einer Veränderung der Oberflächenzähigkeit der kolloiden Lösung äußert. Wie damals ausgeführt wurde, ist die Oberflächenspannung eine komplexe Größe, die gleichzeitig ein sehr einseitiges Bild der Oberflächeneigenschaften einer kolloiden Lösung gibt. Lösungen von gleicher Oberflächenspannung können größere oder geringere Oberflächenzähigkeit besitzen, Veränderungen der Oberflächenspannung gehen einher mit Veränderungen der Oberflächenzähigkeit nach der einen oder anderen Richtung, und gerade die Oberflächeneigenschaften einer verdünnten Eiweiß-Lipoidlösung, mit der *Ascoli* und *Izar* arbeiten, sind durch Messung der Oberflächenzähigkeit mittels der Kompaßmethode viel schärfer zu verfolgen als durch Messung der Oberflächenspannung mittels Stalagmometers oder Kapillare.

Das Prinzip dieser Kompaßmethode besteht darin, daß eine in der Oberfläche der Flüssigkeit schwingende Kompaßnadel in der Ostwestlinie fixiert wird, und daß man dann die Zeit feststellt, die sie gebraucht, um in den Nordmeridian einzuschwingen. Ein Vergleich mit der Stalagmometermethode ergibt die außerordentliche Empfindlichkeit dieses Meßverfahrens.

Die stalagmometrische Differenz von Serumlösungen 1 : 4000 und 1 : 16000 liegt innerhalb der Fehlerbreite der Methode. Demgegenüber seien für die Kompaßmethode folgende Zahlen angeführt:

Zeit nach Ansetzen der Lösung	Schwingungszeit der Kompaßnadel in Intervallen von 1/2 zu 1/2 Minute	
	Serumlösung 1 : 50000	Serumlösung 1 : 100000
1′	7 7 7	7 7 7
5	12 13 13	7 7 7
10	∞	8 8 8
15	—	8 8 9
30	—	9 10 13

Die Kompaßmethode liefert also bei erstaunlich hohen Verdünnungen, wo Stalagmometer und Kapillare völlig versagen, noch scharf definierte Zahlen.

Wir haben uns daher gemeinsam der Frage zugewandt, ob es gelingt, die von *Ascoli* und *Izar* geforderten Oberflächenveränderungen mit Hilfe der Kompaßmethode zu erfassen. Diese Frage lag um so

[1]) *F. Eichholtz*, diese Zeitschr. **128**, 310, 1922.

näher, als die beiden Autoren oft erst bei größten Verdünnungen zu positiven Ergebnissen kamen und andererseits, weil aus den letzten Untersuchungen von *Izar* mit voller Schärfe hervorgeht, daß es sich bei dem Vorgang der Meiostagminreaktion um Adsorptionswirkungen im Eiweißlipoidsystem handelt, die sich nach unseren Untersuchungen mit Hilfe der Kompaßmethode besonders scharf erfassen lassen.

Die Meiostagminreaktion in ihrer ursprünglichen Fassung beruht bekanntlich darauf, daß Antigene dem stark verdünnten Serum zugesetzt werden. Das Antigen tritt mit den Serumeiweißkörpern in Wechselwirkung, und je nachdem ein Normal- oder Immunserum vorliegt, ergibt sich eine größere oder geringere Verminderung der Oberflächenspannung. Die Immunreaktion wird so hinausprojiziert in die nackte Tropfenzahl des Stalagmometers.

Ascoli und *Izar* machten ihre ersten Beobachtungen am Serum von Typhuskranken. Wir nahmen diese Untersuchungen mit der neuen Methode auf und hielten uns bei der Vorbereitung der Lösungen streng an die Vorschriften der beiden Autoren.

2 bis 3 ccm Typhusserum mit starkem Agglutinationstiter wurden zehnfach verdünnt. Zu 9 ccm der Lösung wurde 1 ccm eines 1 prom. Typhusbazillenextraktes nach *Neisser* und *Shija*[1]) zugesetzt. Die gleichen Mischungen wurden mit Normalserum hergestellt und je eine Probe der derart behandelten Serumlösung 2 Stunden lang bei 50^0 gehalten. Zwei weitere Proben wurden nicht bebrütet.

Die vier Lösungen wurden sodann mit Leitungswasser 600fach verdünnt, 1 Minute stark geschüttelt und nach 5 Minuten in den Kompaßteller eingefüllt. Hierbei ergaben sich folgende Werte:

Zeit nach Ansetzen der Lösung	Schwingungszeit im Normalserum						Schwingungszeit im Typhusserum					
	nicht bebrütet		bebrütet		nicht bebrütet		bebrütet	
30″	7″	7″	7″	7″	7″	7″	7″	7″
60	7	7	8	8	7	7	8	8
120	8	9	12	10	8	8	12	14
180	10	11	17	15	12	11	17	20
240	15	16	—		20	19	—	

Es ergibt sich also, daß durch die Bebrütung in beiden Fällen eine geringe Veränderung der Oberflächenzähigkeit eintritt, daß aber eine besondere Beeinflussung von Typhusserum gegenüber dem Normalserum nicht festzustellen ist.

Das gleiche völlig negative Resultat ergab sich in einer Reihe anderer Versuche.

---

[1]) *M. Neisser* und *K. Shija*, Deutsche med. Wochenschr. 1903, S. 61.

Ebenso erhielten wir ein negatives Ergebnis, als wir darauf ausgingen, im System Luesserum—Rinderherzextrakt nach Bebrütung eine spezifische Beeinflussung der Oberflächenzähigkeit zu erhalten. Wir verzichten darauf, entsprechende Zahlen wiederzugeben.

Die spezifische Beeinflussung der Oberflächenspannung, die von *Ascoli* und *Izar* bei Typhus und Lues gefunden wurde, findet also keinen Halt in der Messung der Oberflächenzähigkeit. Das sollte stutzig machen; denn gerade bei den Eiweißlösungen gehen Oberflächenspannung und Oberflächenzähigkeit sehr weit parallel, und es ist schwer einzusehen, daß derartige Unterschiede, wie sie *Ascoli* und *Izar* bei der Meiostagminreaktion der beiden Infektionskrankheiten angeben, die Oberflächenzähigkeit unbeeinflußt lassen sollten. Es kommt eine weitere Überlegung hinzu. Ganz unzweifelhaft beruhen die Immunreaktionen zum Teil auf spezifischen oder unspezifischen Adsorptionswirkungen zwischen Eiweißkörpern und Lipoiden. Und wieder muß darauf hingewiesen werden, daß derartige Adsorptionswirkungen sich mit Hilfe der Kompaßmethode in außerordentlich prägnanter Weise erfassen lassen, und zwar auch dann, wenn das Stalagmometer völlig versagt.

Wir kommen somit zum Schluß, daß die spezifischen Adsorptionserscheinungen zwischen Eiweißkörpern und Lipoiden im System Typhusserum—Antigen zu gering sind, als daß sie sich mit Hilfe der Kompaßmethode nachweisen ließen. Um so aussichtsloser wird daher das Bestreben sein, diese Verhältnisse mit dem Stalagmometer zu erfassen.

Kann man überhaupt durch Messung der Oberflächenzähigkeit spezifische Adsorptionswirkungen zwischen Lipoiden und Eiweißkörpern exakter nachweisen als mit anderen Methoden?

Um diese Frage zu klären, arbeiteten wir mit Luesserum, das gemäß der dritten Modifikation der Meinickereaktion[1]) vorbehandelt war, und zwar wurden nur solche Blutproben untersucht, die starke Wassermann- und Meinickereaktion ergaben. Herr Dr. *Felke* hatte die Güte, die Blutproben nach den Vorschriften von *Meinicke* vorzubehandeln. Die Proben wurden mit Wasser verdünnt, so daß sich eine Serumlösung 1 : 6000 ergab, und sodann mit der Kompaßmethode ausgewertet. Ein anderer Teil der gleichen Blutproben, der indessen nicht der Brutschranktemperatur ausgesetzt worden war, wurde in gleicher Weise verdünnt und ausgewertet. Zum Vergleich wurde entsprechend vorbehandeltes Normalserum herangezogen. Es ergab sich kein Unterschied.

[1]) *E. Meinicke*, Münch. med. Wochenschr. 1919, Nr. 33, S. 931.

Die Kompaßmethode ist also weniger empfindlich als die Meinickereaktion.

Wir sprechen zum Schluß Herrn Prof. *v. Wasielewski* sowie Herrn Dr. *Felke* für ihre Unterstützung unseren besten Dank aus.

Zusammenfassung.

Die Kompaßmethode erfaßt die Oberflächenveränderungen einer Serumlösung weitaus schärfer als das Stalagmometer.

Sie gibt keine Stütze für die Meiostagminreaktion bei Typhus und Lues.

Die Methode ist unempfindlicher als die Meinickereaktion.

Über Wärmeproduktion, Kohlensäureabgabe und Milchsäurebildung bei der Anoxybiose des Frosches.

Von

E. J. Lesser.

(Aus dem Laboratorium der städtischen Krankenanstalten in Mannheim.)

(Eingegangen am 27. Juni 1923.)

Mit 2 Abbildungen im Text.

Ich habe im Jahre 1908 Versuche[1]) veröffentlicht, in denen die oxybiotische Wärme- und Kohlensäureausgabe von Fröschen mit der anoxybiotischen bei 0° verglichen wurde. Diese Versuche sind von *Tigerstedt*[2]) und von *A. V. Hill*[3]) besprochen worden. *Tigerstedt* hat mit Recht hervorgehoben, daß die oxybiotische Wärmeproduktion im Verhältnis zur gleichzeitig abgegebenen Kohlensäure erheblich zu hoch gefunden wurde. Für die damals gezogenen Schlußfolgerungen war dies zwar nicht von prinzipieller Bedeutung, dennoch schien es mir wünschenswert[4]), die Versuche unter Vermeidung solcher Fehler zu wiederholen. Entstanden ist der Fehler höchstwahrscheinlich dadurch, daß bei diesen Versuchen nicht ventiliert wurde. Die Kohlensäure häufte sich im Versuchsraum an, so daß in diesem am Schluß des Versuches bis zu 3 Proz. Kohlensäure enthalten waren. Bei diesem Kohlensäuredruck scheint bei 0° die oxybiotische Kohlensäureabgabe kleiner zu sein als die Kohlensäureproduktion. Daher kommt es höchstwahrscheinlich, daß in dem Versuche, in welchem der Kohlensäuregehalt des Versuchsraumes am Schluß nur 0,9 Proz. betrug, die Kalorienproduktion im Verhältnis zur Kohlensäureausgabe nur um eine verhältnismäßig kleine Größe zu hoch gefunden wurde, wie dies die folgende Tabelle zeigt.

CO_2 in Proz. im Versuchsraum am Schluß der Versuche	g-cal pro 1 mg CO_2	Höchstmöglicher Wert Kalorien pro mg CO_2
3,6	5,0	
2,6	4,9	3,4
2,4	4,5	
0,9	3,6	

[1]) *E. J. Lesser*, Zeitschr. f. Biol. **51**, 287.

[2]) *Tigerstedt*, Wintersteins Handbuch d. vgl. Physiol. **3**, 2. Hälfte, S. 4.

[3]) *A. V. Hill*, Ergebn. d. Physiol. **15**, 367.

[4]) *E. J. Lesser*, Das Leben ohne Sauerstoff. Vortrag in der Berl. physiol. Gesellschaft am 2. Februar 1912. Med. Klinik 1912, S. 445.

Die Kritik *A. V. Hills* geht nach zwei Richtungen. *Hill* nimmt an, daß der anoxybiotische Prozeß beim Frosch nur in Milchsäurebildung besteht, und daß die anoxybiotisch beim Frosch erscheinende Kohlensäure durch Milchsäure aus Bicarbonat freigemacht wird. Diese Annahme *Hills* hat sich mir bei den im folgenden mitzuteilenden Versuchen als durchaus möglich erwiesen. Hätte ich dies zu der Zeit, als ich diese Versuche zuerst anstellte, bereits als wahrscheinlich angenommen, so wäre es unnötig gewesen, sie zu machen. Damals war aber die allgemeine Meinung eine andere. Man stützte sich auf die Autorität *Pflügers*[1]), der angenommen hatte, daß die Kohlensäure, welche in Luft und in Stickstoff vom Frosche abgegeben werde, *ein und demselben chemischen Prozesse entstamme.* Ich wies nach, daß dies nicht der Fall sein könne, weil, bei unter anoxybiotischen Bedingungen abgegebener Kohlensäure, pro Milligramm Kohlensäure nur 35 Proz. der oxybiotisch erhaltbaren Wärmemenge gefunden werde. Aber auch diesen Nachweis sieht *Hill* nicht als gelungen an. Wie mir scheint zu Unrecht. *Hill* nimmt an, daß bei Anoxybiose zu Beginn der Wärmemessung in meinen Versuchen noch so viel Sauerstoff in den Fröschen enthalten gewesen sei, daß diese noch 2½ Stunden lang Wärme auf Kosten oxydativer Prozesse hätten abgeben können, denn in 1 g mit Luft gesättigten Muskels seien bei 0° 0,01 ccm Sauerstoff enthalten. Meine Versuche hätten „gewöhnlich" 3 bis 6 Stunden gedauert, also sei die Wärmebildung zum großen Teil auf noch im Tiere vorhandenen Sauerstoff zu beziehen. Hätte *Hill* meine Arbeit nur ein wenig genauer angesehen, so würde er bemerkt haben, daß diese seine kritischen Bemerkungen falsch sein müssen. Ich habe fünf Versuche mitgeteilt, drei davon dauerten je 3, 5¾ und 6 Stunden, *zwei andere aber 14½ und 15 Stunden.* Im Mittel der drei kurzdauernden Versuche werden pro Milligramm Kohlensäure 1,5 g-cal abgegeben, im Mittel der zwei langdauernden 1,7 g-cal pro Milligramm Kohlensäure. Ein wesentlicher Unterschied in bezug auf die Wärmetönung des zur Kohlensäureabgabe führenden Prozesses läßt sich in kurz- und langdauernden Versuchen nicht feststellen. Im ersteren Falle müßte sich aber, wenn *Hills* Annahmen richtig wären, eine erheblich größere Wärmetönung pro Milligramm Kohlensäure ergeben. *Hill* setzt ohne weiteres die Verhältnisse im herausgeschnittenen Muskel mit denen im ganzen lebenden Tiere gleich. Das ist irrtümlich. Zu Beginn des anoxybiotischen Versuches, aber vor Beginn von Kohlensäurebestimmung und Wärmemessung, wurde ¾ Stunden lang Stickstoff durch den Versuchsraum geleitet. In dieser Zeit atmen die Tiere sehr heftig und in ihren Lungen findet ein Ausgleich zwischen der

[1]) Pflügers Arch. **10**, 313.

Sauerstoffspannung ihres Blutes und der der Alveolarluft statt. Dies sauerstoffarme Blut strömt dann durch den Körper des Tieres. Infolgedessen ist zu Beginn der Wärmemessung, nachdem 3/4 Stunden lang ein starker Strom reinen Stickstoffs (etwa 200 ccm pro Minute) durch den Versuchsraum geleitet war, in dem zu Anfang der Durchleitung etwa 30 ccm Sauerstoff vorhanden waren, der Körper des Tieres nicht mehr einem mit Luft gesättigten Muskel zu vergleichen. Wahrscheinlich sind, da ja das Tier auch in diesen 3/4 Stunden Sauerstoff verbraucht, soweit solcher vorhanden, Sauerstoffmengen, welche für die gleichzeitig beobachtete Wärmeproduktion verantwortlich zu machen wären, nicht mehr vorhanden gewesen. Es gibt indessen ein einfaches Mittel, um die Irrtümlichkeit der *Hill*schen Kritik nachzuweisen. Man wiederholt den Versuch bei Zimmertemperatur. Bei Zimmertemperatur produziert ein Frosch von 100 g nach *Hill* 50 Cal pro Stunde. Der nach *Hill* in 100 g Froschmuskel enthaltene Sauerstoff müßte also in wenigen Minuten verbraucht sein. Ergeben sich unter diesen Bedingungen die gleichen Verhältnisse wie bei 0°, so ist die Unrichtigkeit der Kritik *Hills* auch durch das Experiment erwiesen.

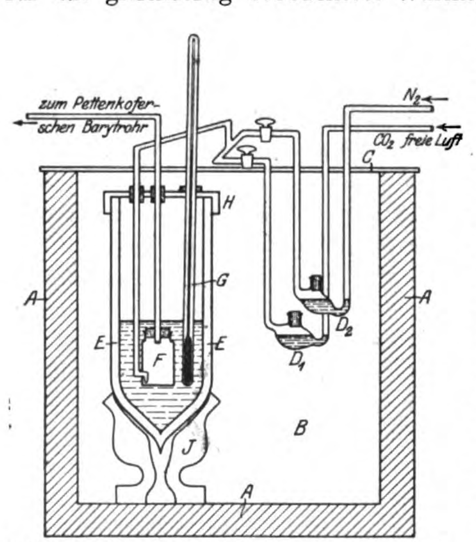


Abb. 1. *A* Wassermantel des Thermostaten. *B* Luftraum des Thermostaten. *C* Holzdeckel. D_1, D_2 Gaswaschfläschchen zur Wasserdampfsättigung der durchgeleiteten Gase. *E* Devargefäß. *F* Tierrezipient. *G* Beckmannthermometer. *H* Filzgefütterter übergreifender Holzdeckel. *J* Holzfuß. Fortgelassen sind in der Zeichnung das zweite Devargefäß und der über die Thermostaten von oben her gestülpte Holzkasten.

Aus diesen Gründen habe ich die früher im Eiskalorimeter bei 0° angestellten Versuche bei Zimmertemperatur wiederholt. Als Kalorimeter diente mir eine Vorrichtung, welche dem *Hill*schen Differentialkalorimeter[1]) nachgebildet war. Zwei zylindrische versilberte Devargefäße von etwa 1,5 Liter Inhalt (10 cm lichte Weite, 28 cm Höhe des Innenraums) stehen auf Holzfüßen in einem Luftthermostaten mit Wassermantel. In jedes der beiden Gefäße, welche mit übergreifendem, Filz gefüttertem Holzdeckel verschlossen sind, kommen 400 ccm destilliertes Wasser. In das Wasser wird der Rezipient, der zur Aufnahme eines größeren oder zweier kleinerer Frösche dient, versenkt. Er hat ein Volumen von etwa 110 ccm, wird mit Gummistopfen verschlossen und ist zur Durchleitung von Gasen eingerichtet, wie aus der Zeichnung zu ersehen. (In der Zeichnung ist das Kontroll-

[1]) *A. V. Hill*, Journ. of Physiol. **43**, 261, 1911.

devargefäß fortgelassen.) Die Gaszuleitungs- und -Ableitungsrohre sind durch durchbohrte Gummistopfen in kleinen Öffnungen des Holzdeckels des Devargefäßes befestigt. Auf diese Weise wird der Tierrezipient im Devargefäß unter Wasser versenkt festgehalten. Auf die gleiche Weise wird das *Beckmann*-Thermometer befestigt, welches die Temperatur des Wassers in jedem der beiden Gefäße bestimmt. Benutzt wurden zwei *Beckmann*sche Thermometer mit Messungsbereich von 1°C geteilt in 0,002 Grade. Sie waren miteinander verglichen und wurden mit von *F. Köhler*, Leipzig, bezogenen Lupen abgelesen. Vor der Ablesung wurde jedes der beiden Thermometer in möglichst gleicher Weise zweimal je ½ Minute lang geklopft. Die Bestimmung der *Hill*schen Konstante ergab für beide Gefäße nach völliger Beschickung nur eine Differenz von 5 Proz. Der Wasserwert des Versuchsgefäßes wurde nach dem Mischungsverfahren bestimmt. Bei kompletter Füllung (400 ccm Wasser; Rezipient, Thermometer) ergab sich der Wert zu 526. Er war auf 1,6 Proz. genau bestimmt. In dem Luftthermostaten befinden sich ferner kleine mit Wasser gefüllte Gaswaschflaschen um die durchzuleitenden Gase bei Thermostatentemperatur mit Wasserdampf zu sättigen. Der Thermostat war an allen vier Seiten geschlossen, nur oben offen, um die Gefäße hineinstellen zu können. Er wurde von oben mit einem Holzdeckel geschlossen, in welchem sich Löcher und Schlitze befanden, um die Thermometer durchzulassen und die Glasrohre und Hähne aufzunehmen. In der schematischen Zeichnung verlaufen die Glasrohre oberhalb des Deckels, in Wirklichkeit befinden sie sich in Schlitzen innerhalb des Holzdeckels, so daß nur die Griffe der beiden Hähne diesen etwas überragen. Nachdem die Schlitze sorgfältig mit Watte zugestopft sind, wird der Holzdeckel mit einer 5 cm hohen Schicht ungewaschener Schafwolle bedeckt, so daß nur noch die Thermometer herausragen. Dann wurde von oben her ein Holzkasten, der an einer Seite eine hochschiebbare Glasscheibe trägt, übergestülpt und alle Fugen an den Seiten, wo der Holzkasten auf dem Thermostaten aufsitzt, sorgfältig mit Watte verstopft. Der Rezipient des Versuchsgefäßes war so eingerichtet, daß je nach der Öffnung und Schließung eines der beiden Hähne sowohl reiner Stickstoff als auch kohlensäurefreie Luft durch ihn hindurchgeleitet werden konnte. Die Bestimmung des Korrektionsfaktors für den Wärmeverlust habe ich in der von *Peters*[1]) angegebenen Weise durchgeführt. Es ergab sich, daß der Korrektionsfaktor von der Differenz zwischen der Zimmer- und der Thermostatentemperatur etwas abhängig war. Stimmte die Zimmertemperatur mit der Thermostatentemperatur (17,5 bis 18,1°) überein, so betrug der Korrektionsfaktor im Mittel aus zahlreichen Versuchen 8,5 Proz. pro Stunde. Ebenso wenn die Zimmertemperatur 1 bis 2° tiefer lag. Lag die Raumtemperatur 3° höher als die Thermostatentemperatur, so betrug der Korrektionsfaktor 7,7 Proz.

In dem aus dem Rezipienten austretenden Gase wurde die Kohlensäure nach *Pettenkofer* bestimmt. Die Versuche wurden stets so angeordnet, daß am Abend vor dem eigentlichen Versuche das Tier in den Rezipienten des Kalorimeters kam, der mit Luft ventiliert wurde. In das Kontrollgefäß wurden so viel Kubikzentimeter Wasser mehr als in das Versuchsgefäß gegeben, als das Versuchstier Gramme wog. Die Temperatur des Wassers im Kalorimetergefäß wurde so weit unter der Thermostatentemperatur gewählt, daß am nächsten Morgen durch die Erwärmung von außen her

[1]) Siehe *A. V. Hill*, Ergebn. d. Physiol. 15, 351.

und durch die vom Versuchstier produzierte Wärme die Temperaturdifferenz zwischen Versuchs- und Kontrollgefäß eben ausgeglichen war. Auf diese Weise wurde die Korrektur für den Wärmeverlust des Kalorimetergefäßes möglichst verkleinert. Der Thermostat war elektrisch mit einer der üblichen elektrischen Heizpatronen heizbar und mit dem *Lautenschläger*schen Thermoregulator versehen. Durch den Wassermantel gingen zwei symmetrisch angeordnete allseits geschlossene Kupferrohre hindurch, durch diese konnte kaltes Wasser aus der Leitung geleitet werden, um den Thermostaten abzukühlen. Die Temperatur desselben wurde im Luftraum zwischen beiden Devargefäßen durch ein Beckmannthermometer gemessen und so reguliert, daß sich die Temperatur des Wassers im Kontrollgefäß möglichst wenig änderte. Die Änderung der Temperatur im Kontrollgefäß schwankte zwischen 0,0076 und 0,0007° pro Stunde. Beide Devargefäße enthielten gleichgroße Tierrezipienten. Durch beide wurde während des Versuchs ungefähr die gleiche Gasmenge geleitet, welche bei gleicher Temperatur mit Feuchtigkeit gesättigt war. Die Ventilation wurde durch *Mariotte*sche Flaschen bewirkt, aus denen Wasser abfloß, das pro Stunde abgeflossene Wasser wurde gemessen. Pro Stunde wurden etwa 500 ccm Luft durchgesaugt, die durch Kalilauge und Natronkalk völlig von Kohlensäure befreit war. Zur Herstellung der Anoxybiose wurden in 10 bis 15 Minuten 1,5 bis 2,5 Liter reiner Stickstoff durchgeleitet[1]). Dann war die Pyrogallusprobe nach *Fletcher* und *Hopkins* negativ. Erst jetzt begann Kohlensäure- und Wärmemessung, mit ständiger Durchleitung von Stickstoff unter leichtem Überdruck. Die Kohlensäure wurde nach *Pettenkofer* bestimmt.

Man erkennt aus dieser Beschreibung, daß ich in drei Punkten von der *Hill*schen Methodik abgewichen bin. Erstens habe ich, da mir kein Thermogalvanometer zur Verfügung steht, die Temperaturdifferenz zwischen beiden Devarflaschen mit Beckmannthermometern gemessen. Das ist umständlicher und ungenauer, hat aber den Vorteil, daß man auch die Temperaturänderungen im Kontrollgefäß kennt, sowie die absolute Temperatur, bei der man arbeitet. Zweitens habe ich die Devargefäße in einen Thermostaten gestellt, ohne das war es in dem einzigen Raum, der mir bisher zur Verfügung stand, unmöglich zu genauen Werten zu kommen. Drittens habe ich die Versuchstiere nicht wie *Hill* unter Wasser versenkt, sondern in Luft untersucht und bei Gasdurchleitung. Bei der geringen spezifischen Wärme der Luft und der geringen Ventilationsgröße können dadurch Fehler nicht entstehen, wenn das durchzuleitende Gas bei der Versuchstemperatur mit Wasserdampf gesättigt ist. Außerdem bewährt sich hier das Differentialverfahren ganz besonders, da auch durch das Kontrollgefäß die gleiche Gasmenge von gleicher Wasserdampftension hindurchgeleitet wird.

Zur genaueren Orientierung lasse ich das Protokoll eines Versuches folgen: Die Temperatur wurde ½stündlich abgelesen, ist der Kürze halber aber nur für ganze Stunden angegeben.

---

[1]) Die Herstellung und Aufbewahrung reinen, sauerstofffreien Stickstoffs ist von mir in der neuen Auflage des Abderhaldenschen Handbuchs der biochemischen Arbeitsmethoden beschrieben, auf welche Beschreibung hier verwiesen sei.

5. Juli 1922. Esculentaweibchen, 52 g schwer, um 6 Uhr nachmittags ins Kalorimeter und mit Luft ventiliert, ins Kontrollgefäß 452 ccm Wasser. Tier vor 2 Monaten gefangen, nicht abgelaicht.

6. Juli 1922. Um 11 Uhr 25 Min. vormittags Versuch begonnen.

Zeit	Temperaturdifferenz zwischen Versuchs- und Kontrollgefäß	Temperatur des Kontrollgefäßes	Thermostatentemperatur	Zimmertemperatur	Pro Stunde durchgesaugtes Luftvolumen	
					Versuchsgefäß	Kontrollgefäß
11h 25′	— 0,0006°	17,6110°	17,280°	22,4°	—	—
12 25	+ 0,0270	17,6110	17,308	22,6	500 ccm	480 ccm
1 25	+ 0,0518	17,6124	17,264	22,7	690 ,,	660 ,,
2 25	+ 0,0714	17,6130	17,213	22,6	630 ,,	580 ,,

Kohlensäurebestimmung ergibt für die Zeit von 11 Uhr 25 Min. bis 2 Uhr 25 Min. 8,2 ccm. Von 2 Uhr 30 Min. bis 2 Uhr 42 Min. werden

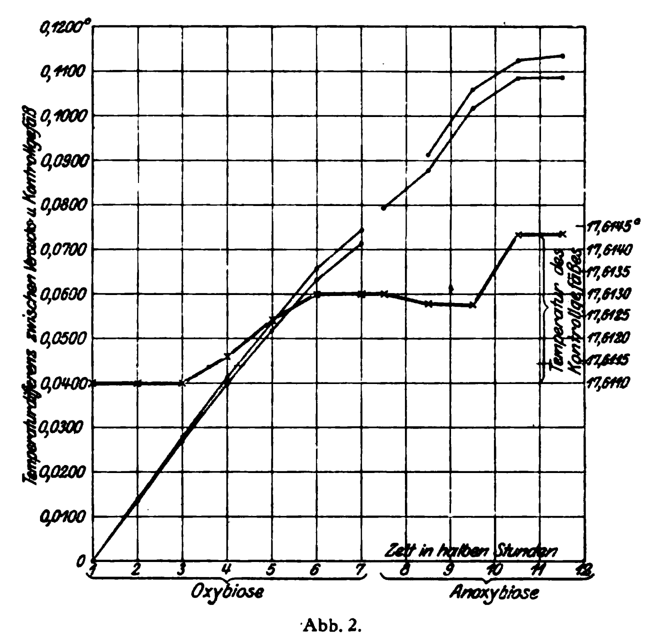


Abb. 2.

durch das Versuchsgefäß 1800 ccm reiner Stickstoff durchgeleitet, dann Pyrogallusprobe im austretenden Gase negativ. Um 2 Uhr 42 Min. Temperaturablesung und Kohlensäurebestimmung von neuem begonnen.

Zeit	Temperaturdifferenz zwischen Versuchs- und Kontrollgefäß	Temperatur des Kontrollgefäßes	Thermostatentemperatur	Zimmertemperatur	Pro Stunde durchgesaugtes Stickstoffvolumen	
					Versuchsgefäß	Kontrollgefäß
2h 42′	0,0794°	17,6130°	17,208°	22,6°	—	—
3 42	0,1018	17,6128	17,310	22,8	750 ccm	530 ccm
4 42	0,1084	17,6144	17,268	22,8	700 ,,	600 ,,

Die Kohlensäurebestimmung ergibt für die Zeit von 2 Uhr 42 Min. bis 4 Uhr 42 Min. 7,11 ccm Kohlensäure. Tier um 4 Uhr 45 Min. aus dem Kalorimeter heraus, sofort in feste Kohlensäure gebracht und gefroren. Milchsäurebestimmung ergibt 0,137 Proz. Milchsäure (korrigierter Wert).

Die Zunahmen der Temperaturdifferenz zwischen Versuchs- und Kontrollgefäß betragen demnach in Luft

1. Stunde	0,0276°,	korrigiert	0,0287°
2. ,,	0,0248	,,	0,0281
3. ,,	0,0196	,,	0,0240

insgesamt 0,0817°. Der Wasserwert betrug 526 + 52 = 578, demnach Kalorien produziert 578 × 0,0808 = 46,7 Cal, demnach Kalorien pro Kubikzentimeter Kohlensäure 46,7, dividiert durch 8,2 = 5,70 Cal pro Kubikzentimeter Kohlensäure. Die Zunahmen der Temperaturdifferenz zwischen Versuchs- und Kontrollgefäß betragen in Stickstoff

1. Stunde	0,0224°,	korrigiert	0,0301°
2. ,,	0,0066	,,	0,0155

insgesamt 0,0456°, demnach Kalorienproduktion 578 × 0,0456 = 26,4 Cal und pro Kubikzentimeter Kohlensäure 3,7 Cal. Der Versuch ist außerdem in der Abb. 1 dargestellt, in der die halbstündlichen Temperaturablesungen wiedergegeben sind. Die untere Kurve stellt die abgelesene Temperaturdifferenz dar, die obere Kurve die korrigierte Temperaturdifferenz zwischen beiden Gefäßen. Die stark ausgezogene Linie gibt die Temperatur des Kontrollgefäßes wieder.

Die Ergebnisse von fünf solchen Versuchen sind in Tabelle I und II dargestellt.

Tabelle I.

Datum	Anoxybiotische Kalorienproduktion pro 100 g Tier			Oxybiotische Kalorienproduktion pro 100 g Tier u. Std.
	1. Stunde	2. Stunde	3. Stunde	
16. V. 1922	32,8	14,1	4,8	—
19. V.	38,7	19,9	9,0	58,7
23. V.	27,3	18,5	—	—
6. VI.	31,6	11,6	5,6	16,6
5. VII.	33,5	17,2	—	30,3
Mittelwerte . .	32,8	16,3	6,5	35,2

Tabelle I zeigt die oxybiotische und außerdem die anoxybiotische Kalorienproduktion für 100 g Tier und Stunde in der ersten, zweiten und dritten Stunde der Anoxybiose. Hierbei ist die Kalorienproduktion der dritten Stunde aus $1/4$ bis $3/4$ Stunden für eine volle Stunde berechnet. Während die Werte für die oxybiotische Wärmeproduktion sehr stark schwanken (die Differenz zwischen der größten und kleinsten Wärmeabgabe beträgt 72 Proz.), ändern sich die Werte für die anoxybiotische

Kalorienproduktion sehr viel weniger. In der ersten Stunde beträgt die Differenz zwischen der größten und der kleinsten Wärmeabgabe 28 Proz. Die anoxybiotische Wärmeproduktion sinkt mit der Zeit sehr stark ab. Sie sinkt in der zweiten Stunde im Mittel auf die Hälfte der Kalorienproduktion der ersten Stunde und von der zweiten auf die dritte noch sehr viel mehr ab. Die sehr kleinen Werte der dritten Stunde sind infolgedessen viel ungenauer als die der ersten Stunde. Dies Ergebnis ist dem, was bei der Anoxybiose des herausgeschnittenen ruhenden Muskels beobachtet wird, völlig entgegengesetzt. Hier hat *Meyerhof* zuerst[1]) angegeben, daß die Wärmeproduktion pro Stunde konstant sei (bei 22° und 24 stündiger Versuchsdauer). Neuerdings[2]) hat er gefunden, daß die Kalorienproduktion bei länger dauerndem Versuche etwas abnahm. Sie betrug aber nach 7 bis 10 Stunden immer noch 70 bis 80 Proz. der anfänglichen Wärmeausgabe. Absolut genommen beträgt die anoxybiotische Kalorienproduktion des nicht enthäuteten Schenkels bei 22° im Mittel 7,8 Cal pro 100 g und Stunde (September), d. h. nicht sehr viel mehr als das ganze Tier in der dritten Stunde bei Anoxybiose abgibt, bei einer etwa 5° niedrigeren Temperatur (6,5 g-cal pro 100 g Tier) (Mai bis Juli). Eine solche Vergleichung des lebenden Tieres und des herausgeschnittenen Organs ist aber nicht ohne weiteres möglich. Zwar werden die Prozesse im lebenden Tiere und im herausgeschnittenen Organe unter gleichen Bedingungen in gleicher Richtung verlaufen. Dabei können sich aber quantitativ erhebliche Unterschiede bemerkbar machen. Zunächst ist zu bedenken, daß das lebende Tier auch in der Anoxybiose Muskelbewegungen ausführen kann, z. B. sind die Atembewegungen in der ersten Stunde der Anoxybiose, mindestens aber in der ersten halben Stunde, immer in der Frequenz vermehrt und außerdem verstärkt (Flankenatmung). Außerdem machen die Tiere in der ersten Stunde der Anoxybiose häufig starke Fluchtbewegungen. Auch dauert ja während der ganzen Dauer der Anoxybiose der Herzschlag an. Davon abgesehen aber können es in der zweiten Stunde der Anoxybiose sichtbare Bewegungen der willkürlichen Muskulatur nicht sein, welche die Wärmeproduktion mindestens doppelt so hoch treiben als der einer gleichschweren herausgeschnittenen Muskelmasse bei einer um 4½° höheren Temperatur entspricht. In der zweiten Stunde der Anoxybiose sind die Reflexe immer schon aufgehoben, und die Tiere sehen aus, als wenn sie kurarisiert wären. Dabei bleiben die motorischen peripheren Nerven, ebenso wie die Muskulatur während der ganzen Dauer dieser Versuche erregbar, die Anoxybiose wirkt also zunächst auf das Zentralnervensystem lähmend, nicht aber auf den motorischen Endapparat wie das Kurare. Man kann daher nicht

[1]) Pflügers Arch. 182, 169.
[2]) Ebendaselbst 195, 43.

ausschließen, daß die Erhöhung der anoxybiotischen Kalorienproduktion in der ersten, besonders aber in der zweiten Stunde auf nervöse Impulse zurückzuführen ist, welche, auch ohne Kontraktion der Muskeln zu bewirken, die Milchsäurebildung vermehren. Eine weitere Differenz zwischen herausgeschnittenem Muskel und lebendem Tiere besteht darin, daß im lebenden Tiere nur ein Teil der Milchsäure im Muskel verbleibt. Ein anderer wird durch das Blut hinweggeführt. Dabei findet Neutralisation der Milchsäure unter Austreibung von Kohlensäure statt, welche gasförmig nach außen abgegeben wird. Nun ist aber die Milchsäurebildung ein Prozeß, der durch Anhäufung von Wasserstoffionen gehemmt wird. Bei Berücksichtigung aller dieser Momente erscheint ein quantitativer Vergleich hinsichtlich des zeitlichen Verlaufes und der absoluten Größe der Wärmebildung bei Anoxybiose im herausgeschnittenen Muskel und im ganzen lebenden Tiere nicht möglich.

Tabelle II.

Datum und Geschlecht	Oxybiose pro 100 g Tier produziert			Anoxybiose pro 100 g Tier produziert			Dauer des Versuches
	CO_2 in mg	g-cal	Cal pro mg CO_2	CO_2 in mg	g-cal	Cal pro mg CO_2	
16. V., ♂, a	—	—	—	34,2	48,0	1,40	2h 15′
19. V., ♂, b	52,6	146,8	2,80	53,9	65,0	1,21	2 45
23. V., ♂, c	—	—	—	24,1	36,6	1,50	1 30
6. VI., ♂, d	15,4	44,8	2,91	30,4	46,0	1,51	2 42
5. VII., ♁, e	20,8	60,6	2,91	26,9	50,7	1,89	2 00
Gesamtmittel	—	—	—	33,9	49,3	1,48	2h 15′
Mittel aus b, d, e	29,6	84,1	2,85	37,1	53,9	1,46	2 29′

In der Tabelle II ist die Kalorienproduktion während der ganzen Dauer der Anoxybiose und ebenso die Kohlensäureausgabe (berechnet für 100 g Tier) zusammengestellt und daraus der Quotient Kalorien pro Milligramm Kohlensäure berechnet. Die oxybiotische Kalorien- und Kohlensäureproduktion ist aus drei- bis vierstündigem Versuche für die gleiche Zeit berechnet, die der anoxybiotische Versuch gedauert hat. Er wurde stets an den oxybiotischen direkt angeschlossen. Im Mittel aus drei Versuchen ergibt sich die anoxybiotische Kalorienproduktion zu 64 Proz. der Oxybiose. Während oxybiotisch pro Milligramm Kohlensäure 2,8 bis 2,9 Cal erscheinen; finden wir anoxybiotisch 1,4 bis 1,9 Cal und im Mittel aus fünf Versuchen 1,48 Cal pro Milligramm Kohlensäure. Der oxybiotische Quotient von im Mittel 2,85 entspricht einem respiratorischen Quotienten von etwa 0,82.

Nach Analogie eines im November angestellten 14tägigen Respirationsversuches mit demselben durchschnittlichen respiratorischen Quotienten (bei dem gleichzeitig auch die Stickstoffausscheidung er-

mittelt wurde) würden 29 Proz. der Kalorien aus Eiweiß stammen, 41 Proz. aus Fett und 30 Proz. aus Glykogen.

Vergleichen wir diese Ergebnisse mit den früher bei 0⁰ im Eiskalorimeter erhaltenen, so ergibt sich weitgehende Übereinstimmung. Genau wie bei 17,6⁰ ist auch bei 0⁰ die Kalorienproduktion in den späteren Stunden nur noch ein kleiner Bruchteil derjenigen, welche in den ersten Stunden gefunden wird. Bei 0⁰ betrug die Kalorienproduktion pro 100 g und Stunde 0,95 bis 1,06 Cal, wenn das Mittel aus 3 bis 6 Stunden gezogen wurde, und 0,26 bis 0,39 Cal, wenn das Mittel aus 15½ Stunden gezogen wird. Die pro 1 mg Kohlensäure ausgegebene Kalorienmenge betrug bei 0⁰ 1,6 Cal im Mittel (1,25 im Minimum und 1,94 im Maximum) und bei 17,6⁰ 1,48 im Mittel (1,89 Maximum, 1,21 Minimum). Nur wird bei 0⁰, verglichen mit der oxybiotischen Kalorienproduktion, anoxybiotisch etwas weniger Wärme produziert. Bei 0⁰ fanden wir anoxybiotisch noch 42 Proz. der oxybiotischen Kalorienproduktion, während bei 17,6⁰ im Mittel 64 Proz. erscheinen. Auf diese Differenz ist aber weniger Gewicht zu legen, da die anoxybiotische Kalorienproduktion im Verhältnis zur oxybiotischen verschieden ausfallen muß, je nachdem sie aus einem kurz- oder langdauernden Versuche berechnet wird. Der Hauptwert dieser Untersuchungen liegt in der Feststellung des zeitlichen Verlaufs der anoxybiotischen Kalorienproduktion und der Ermittlung des Quotienten Kalorien pro Milligramm Kohlensäure. *Beides ist bei 0⁰* und *bei 17,6⁰ dasselbe. Würde, wie A. V. Hill gemeint hat, in meinen Eiskalorimeterversuchen ein beträchtlicher Teil der Wärmeproduktion aus Oxydationsprozessen herleitbar sein, welche auf Kosten des im Tiere bei Beginn der Versuche noch vorhandenen Sauerstoffs vor sich gingen, so könnte der Quotient Kalorie pro Milligramm Kohlensäure bei 0⁰ und 17,6⁰ unter anoxybiotischen Bedingungen nicht derselbe sein.* Er müßte bei dieser hohen Temperatur, bei welcher der im Gewebe gelöste Sauerstoff in wenigen Minuten verbraucht sein muß, einen erheblich kleineren Wert aufweisen. *Mithin ist damals durch diese Versuche in der Tat bewiesen worden, daß es eine Sauerstoffspeicherung nicht gibt.* Da damals der Stoffwechsel des Muskels trotz der klassischen Versuche von *Fletcher* und *Hopkins* noch im wesentlichen ungeklärt war, während jetzt durch die Reihe glänzender Arbeiten von *A. V. Hill*, *Parnas*, *v. Weizsäcker* und *Meyerhof* dieses Problem aufgehellt ist, hatte diese Feststellung 1908 eine ganz andere Bedeutung, als ihr vielleicht heute noch zukommt.

Nun bin ich aber damals von der Meinung ausgegangen, daß die anoxybiotisch beim Frosche abgegebene Kohlensäure einem Gärungsprozeß entstamme, bei dem ähnlich wie bei Askaris Fettsäure und Kohlensäure (*Bunge*, *Weinland*) entstehe. Umgekehrt hat *Hill* angenommen, daß die anoxybiotisch vom Frosche abgegebene Kohlen-

säure nur durch Milchsäure aus Bicarbonat freigemachte Kohlensäure sei. Ein eigentlicher experimenteller Beweis, daß dem so ist, fehlt bisher für das ganze Tier. Ich habe daher versucht, gleichzeitig mit Kohlensäureabgabe und Wärmebildung, die unter anoxybiotischen Bedingungen beim lebenden Tiere entstehende Milchsäure zu bestimmen. Dies ist keine einfache Aufgabe, weil es für die Analyse unbedingt nötig ist, das Tier zu zerkleinern. Wie wir seit *Fletcher* und *Hopkins* wissen, ruft aber diese Zerkleinerung bereits eine sehr erhebliche Milchsäurebildung hervor. Daher muß die Zerkleinerung bei so niederer Temperatur ausgeführt werden, daß es dabei zu keiner oder nur sehr geringer Milchsäurebildung kommt.

Ich bin so vorgegangen, daß der Frosch zunächst in fester Kohlensäure steinhart gefroren wurde, dann wurde er mit einem mit fester Kohlensäure gekühlten Brotschneideapparat, wie er in den Haushaltungen benutzt wird, in möglichst dünne Scheiben zerschnitten. Ein möglichst großer Teil dieser wurde rasch gewogen und sofort in 96proz. Alkohol gebracht, der auf -10^0 abgekühlt war. Aus diesem wurden die einzelnen Scheiben mit Pinzette herausgenommen und mit Quarzsand unter gekühltem Alkohol in gekühlter Reibschale verrieben. Nachdem alles Gewogene verrieben war, wobei die Temperatur auf $+2^0$ etwa stieg, wurde von dem Rückstand dekantiert, noch einmal mit Alkohol verrieben und wieder dekantiert. Der alkoholische Extrakt blieb bis zum nächsten Tage stehen und wurde dann durch glattes Filter filtriert. Der Rückstand wurde so lange mit stets neuen Alkoholmengen extrahiert, bis das zunächst stark gelb gefärbte Filtrat farblos wurde. Sämtliche vereinigten Filtrate wurden auf dem Wasserbade verdunstet, unter größter Vorsicht, damit der Extrakt nicht länger auf dem Wasserbade blieb als unbedingt notwendig war, um ihn zur Trockne zu bringen. Dann wurde der Rückstand mit Wasser aufgenommen und mit allem Ungelösten auf 100 ccm aufgefüllt. 50 ccm wurden mit festem Quecksilberacetat versetzt, das Filtrat mit Schwefelwasserstoff vom Quecksilber befreit und nach Verjagung des Schwefelwasserstoffs in einem aliquoten Teil die reduzierende Substanz bestimmt. Die anderen 50 ccm wurden in einen 100-ccm-Meßkolben gebracht in den vorher 52 g fein gepulvertes Ammonsulfat in Substanz gegeben war. Durch Erwärmen und Wasserzugabe wurde das Ammonsulfat gelöst und bis nahezu zur Marke mit Wasser aufgefüllt. Dann wurde abgekühlt, zur Marke aufgefüllt und filtriert. Das Filtrat war stets völlig klar, mitunter eine Spur gelblich tingiert. In einem aliquoten Teil wurde ohne Extraktion die Milchsäure nach dem Aldehydverfahren nach *v. Fürth* und *Charnas*, *Parnas* und *Meyerhof* bestimmt. Die Unterlassung der Extraktion vor der Aldehydbestimmung geschah nach den Angaben von *Meyerhof*[1]).

Die aus der Titration berechneten Werte wurden um 12 Proz. erhöht, gemäß Bestimmungen an wasserfreiem Lithiumlactat, bei denen sich im Durchschnitt bei dem Aldehydverfahren 12 Proz. Defizit ergeben haben. Alle Werte sind Mittelwerte aus mindestens zwei gut übereinstimmenden Einzelbestimmungen. Die Reste der Ammonsulfat gesättigten Extrakte wurden genau gemessen und vereinigt, im *Lind*schen Apparat mit Äther extrahiert und nach der Methode von *Neubauer* das Zinksalz dargestellt

---

[1]) *Meyerhof*, Pflügers Arch. 188, 117, 1921.

(Biochem. Arbeitsmethoden 2, 1254). Die Wägung des Zinksalzes ergab 4 bis 10 Proz. Verluste gegenüber den Werten des Aldehydverfahrens. Augenscheinlich war trotz 50- bis 60stündiger Extraktion die Milchsäure nicht vollständig extrahiert worden. Bei erneuter 10stündiger Extraktion gelang die Darstellung eines Zinksalzes nicht mehr, weil die Ausfällung des Bleies aus dem Bleisalz der Milchsäure durch Schwefelwasserstoff mißlang. Das Bleisulfat fiel kolloidal aus und war nicht filtrierbar.

Tabelle III.

Datum	Geschlecht	Milchsäure in 100 g Tier	Traubenzucker in 100 g Tier	Bemerkungen
8. I. 1922	♂	0,036	0,011	
16. I.	♂	0,021	0,00	
10. III.	♂	0,030	0,0225	
1. VI.	♂	0,025	[0,065]	Tier vorher auf Eis
29. VI.	♂	0,021	0,018	13 Min. durch den Rezipienten reiner N_2 durchgeleitet
	Mittelwert	0,0266	0,0129	

Zunächst wurde ermittelt, welche Werte sich bei Anwendung dieser Methode bei normalen Tieren ergaben (Tabelle III). Im Mittel aus fünf Bestimmungen wurden 0,0266 Proz. Milchsäure und im Mittel aus vier Bestimmungen 0,0129 Proz. Traubenzucker erhalten. Die Milchsäurewerte änderten sich weder durch vorheriges Abkühlen der lebenden Frösche auf 0° (Versuch vom 1. Juni), noch dadurch, daß die Tiere vorher in den Kalorimeterrezipienten gebracht wurden, durch den 22 Stunden lang Luft und dann in 13 Minuten 2 Liter reiner Stickstoff geleitet war. Dagegen wiesen die Tiere, welche vor dem Einbringen in feste Kohlensäure auf 0° abgekühlt waren, einen erheblich höheren Zuckergehalt auf (0,065 Proz). Dieser Wert ist daher beim Ziehen der Mittelwerte nicht berücksichtigt worden. Leider wurde es versäumt, nachzusehen, ob sich der Reduktionswert (nach *Bertrand* ermittelt) durch vorherige Hydrolyse änderte.

Tabelle IV zeigt die Werte, welche bei vier Versuchen im Januar und Februar erhalten wurden. Die Tiere befanden sich bei diesen Versuchen bei etwa 17,5° im Rezipienten des Kalorimeters, doch wurde die Kalorienproduktion nicht ermittelt. Die Zahlen in der Tabelle

Tabelle IV.

Datum	Geschlecht	Milchsäure	Reduzierende Substanz	CO_2 pro 100 g Frosch mg	Dauer der Anoxybiose	Dauer der Zwischenperiode
		pro 100 g Tier gebildet in g				
30. I. 1922	♂	0,114	0,1095	22,1	2h 45′	12′
2. II.	♂	0,076	0,095	26,2	2 30	10
9. II.	♂	0,068	0,107	16,0	2 10	16
27. II.	♂	0,132	0,098	34,8	4 09	7
		0,0975	0,1024	24,8	2h 53′	

sind so gewonnen, daß von den pro 100 g Tier nach zwei- bis vierstündiger Anoxybiose erhaltenen Werten, die bei normalen Tieren (gemäß dem Mittelwert von Tabelle III) gefundenen Zahlen abgezogen wurden. Im Versuche vom 30. Januar war z. B. der wirklich gefundene korrigierte Wert für die Milchsäure in 100 g Tier 0,141 Proz. Nach Abzug des Normalwertes von 0,026 Proz. ergibt sich dann die gebildete Milchsäure zu 0,114 Proz. In dieser Weise ist bisher die Milchsäurebildung immer berechnet worden. Ob es in unserem Falle ganz zutreffend ist, erscheint fraglich. Die gefundene Milchsäure beim Normaltiere ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, daß bei den Vorbereitungen zur Analyse und während der Alkoholextraktion geringe Milchsäuremengen gebildet werden. Diese entstehen bei einer p_H, welche der Normalen der Gewebe entspricht. Ist durch Anoxybiose aber bereits intra vitam eine erhebliche Milchsäuremenge gebildet, so ist dadurch die p_H der Gewebe nach der sauren Seite verschoben. Es ist möglich, daß nunmehr durch die Vorbereitungen zur Analyse und die Alkoholextraktion weniger Milchsäure gebildet wird als bei der Analyse eines Normaltieres. Die in der Tabelle angegebenen Milchsäurewerte sind daher eher zu klein als zu groß. Es werden, wie aus dem Mittelwerte der Tabelle hervorgeht, etwa gleiche Mengen Milchsäure und reduzierende Substanz gebildet. In Wahrheit wird aber die hydrolysierte Glykogenmenge wohl größer gewesen sein als der ermittelten reduzierenden Substanz entspricht, denn leider wurde versäumt nachzusehen, ob der Reduktionswert durch Säurehydrolyse vermehrt wurde. Auch bei nahezu gleicher Versuchsdauer schwanken die Werte für die Milchsäureproduktion von Tier zu Tier ziemlich beträchtlich, so daß aus diesen Versuchen ein Schluß auf den zeitlichen Verlauf der Milchsäurebildung nicht gezogen werden kann. Ebensowenig ist dies für die Kohlensäureproduktion möglich. Im Mittel der vier Versuche entstehen etwa 25 Proz. des Gewichtes der gebildeten Milchsäure an Kohlensäure.

Tabelle V enthält fünf Versuche, die bei Temperaturen zwischen 17,5 und 17,8^0 im Mai, Juni und Juli angestellt wurden. Bei diesen Versuchen wurde gleichzeitig die Bildung von Milchsäure, Traubenzucker und Wärme, sowie die Abgabe der Kohlensäure bestimmt. Der Reduktionswert wurde vor und nach Hydrolyse ermittelt. Hierbei ergab sich bei den ersten beiden Versuchen ein erhebliches Anwachsen, bei den späteren keine Änderung. Im Mittel ergibt sich durch vorherige Hydrolyse eine Zunahme um etwa 30 Proz. Von den Zahlen für Milchsäure und Traubenzucker gilt das gleiche wie für die Zahlen der Tabelle IV. Sie sind durch Abzug der Normalwerte von den gefundenen Werten erhalten worden. Der Mittelwert für die gebildete Milchsäure liegt trotz kürzerer Versuchsdauer erheblich höher als in

Tabelle V.

Datum	Geschlecht	In der Anoxybiose pro 100 g Tier gebildet: Milchsäure in g	Reduzierende Substanz als Traubenzucker: vor der Hydrolyse	Reduzierende Substanz als Traubenzucker: nach der Hydrolyse	Kalorien	CO_2 in mg	Kalorien pro 1 g Milchsäure	Kalorien pro 1 mg CO_2	Dauer der Anoxybiose	Dauer der Vorperiode
16. V.	♂	0,163	0,176	0,299	48,0	34,2	295	1,40	2h 15′	13′
19. V.	♂	0,171	0,078	0,093	65,0	53,9	380	1,21	2 45	15
23. V.	♂	0,106	0,056	0,056	36,6	24,1	346	1,50	1 30	14
6. VI.	♂	0,111	0,025	0,025	46,0	30,4	414	1,51	2 42	10
5. VII.	♀	0,137	0,067	—	50,7	26,9	370	1,89	2 0	12
Mittelwerte:		0,1375	0,0804	0,118	49,3	33,9	361	1,48	2h 15′	13′

den Winterversuchen (bei 40 Proz. höher). Das gleiche gilt für die abgegebene Kohlensäure. Es ist das der bekannte, bisher völlig ungeklärte Saisoneinfluß auf die Milchsäurebildung. Dagegen liegt die gebildete Zuckermenge erheblich unter dem Mittelwerte der Winterversuche, was durch den erheblich geringeren Glykogengehalt der Sommertiere seine Erklärung findet. Das Verhältnis von Milchsäure zu Kohlensäure ist genau das gleiche wie in den Wintermonaten, nämlich 4 : 1. In beiden Fällen würde also die gefundene Milchsäuremenge ausreichen, um die doppelte Menge Kohlensäure aus Bicarbonat in Freiheit zu setzen, welche im Versuche als von den Fröschen ausgegeben ermittelt wurde. Wird angenommen, daß die ausgetriebene Kohlensäure aus Bicarbonat stammt, so sind 50 Proz. der gebildeten Milchsäure durch Alkali neutralisiert worden. Nun fand *Meyerhof* einen mittleren Gehalt des Froschmuskels an Kohlensäure von 21 mg pro 100 g Muskel. Rechnen wir die Muskulatur des Frosches zu 50 Proz. des Körpergewichtes, so könnten 100 g Tier etwa 11 mg Kohlensäure im Muskel enthalten. Da in den Wintermonaten 25 mg, in den Sommermonaten 34 mg Kohlensäure in der Anoxybiose abgegeben worden sind, muß ein beträchtlicher Teil freier Milchsäure aus dem Muskel ins Blut übergetreten sein und Kohlensäure aus dem Blute ausgetrieben haben, wobei allerdings fraglich bleibt, ob eine so große Kohlensäuremenge in dem Blute von 100 g Frosch enthalten sein kann. Für den Übergang von Milchsäure ins Blut und Austreibung von Kohlensäure aus demselben könnte der Vergleich des zeitlichen Verlaufes der Wärmeproduktion mit der gleichzeitigen Kohlensäureausgabe angeführt werden. Denn in einigen Versuchen wurde auch die Kohlensäureausgabe fraktioniert bestimmt. Dabei ergab sich im Mittel ein Absinken der Kohlensäureabgabe von der ersten zur zweiten Stunde der Anoxybiose im Verhältnis von 100 : 71, während die Wärmeausgabe gleichzeitig im Verhältnis von 100 : 36,5 sank, der Quotient Kalorien : Kubikzentimeter Kohlensäure betrug daher im Mittel in der ersten

Stunde 3,88, in der zweiten Stunde 2,23. Es ist also möglich, daß in der zweiten Stunde (früher gebildete) Milchsäure aus dem Muskel in das Blut übertritt und dort Kohlensäure austreibt. Von großem Interesse ist der Wärmewert, der pro Gramm Milchsäure erhalten wird. Er beträgt 361 Cal im Mittel (Maximum 414, Minimum 295). Der mittlere Fehler ist $\pm$ 20 Cal, der wahrscheinliche Fehler beträgt $\pm$ 13 Cal oder $\pm$ 3,6 Proz. Dieser Wert liegt dem Mittelwerte, welchen *Meyerhof* auf Grund von 21 Einzelversuchen bei der Reizung des ausgeschnittenen Froschmuskels erhalten hat, sehr nahe. Nach *Meyerhofs* schönen Versuchen und scharfsinnigen Überlegungen setzt sich dabei die Wärmetönung pro 1 g Milchsäure aus folgenden Teilprozessen zusammen:

Wärmetönung beim Übergang von Glykogen in Milchsäure .	157 Cal
Verdünnungswärme der Milchsäure	14 ,,
Entionisierungswärme des Muskeleiweißes	137 ,,
Summe	308 Cal.

Unerklärt bleibt dabei zunächst das Entstehen von etwa 60 Cal. *Meyerhof* stellt die Hypothese auf, daß die Entionisierungswärme des Eiweißes infolge besonderer Verhältnisse innerhalb der Muskelzelle um diese Größe vermehrt ist. Die Milchsäuremenge, welche in seinen Versuchen Kohlensäure ausgetrieben hat, schätzt er auf maximal 10 Proz., und hat sie wohl aus diesem Grunde in der Rechnung nicht berücksichtigt. Würde man sie berücksichtigen, so würden sich die ungedeckten Kalorien nur unwesentlich vermehren, statt 60 Cal würden sie etwa 74 Cal betragen. In unseren Versuchen hat die Milchsäure aber 25 Proz. ihres Eigengewichtes an Kohlensäure ausgetrieben. Die Wärmetönung dieses Prozesses:

$$NaHCO_3 + C_3H_6O_3 = NaC_3H_5O_3 + H_2O + CO_2,$$

beträgt etwa 20 Cal pro Gramm Milchsäure, sie darf beim ganzen Tiere nicht vernachlässigt werden. Nach der oben angeführten Gleichung hat in unserem Falle die Hälfte der Milchsäure reagiert. Es ergibt daher die Rechnung pro Gramm Milchsäure:

Wärmetönung beim Übergang von Glykogen in Milchsäure .	157 Cal
Verdünnungswärme der Milchsäure	14 ,,
Neutralisationswärme von 0,5 g Milchsäure	10 ,,
Entionisierungswärme des Eiweißes pro 0,5 g Milchsäure	69 ,,
Summe	250 Cal.

Ungedeckt bleiben demnach 111 Cal. Nun entstehen auf 137,5 mg Milchsäure mindestens 80 mg Dextrose, d. h. pro 1 g Milchsäure mindestens 0,6 g Dextrose. Die Hydrolysenwärme des Glykogens beträgt (Verbrennungswärme von 0,9 g Glykogen 3772, von 1 g Dextrose 3762) pro 1 g Dextrose 10 Cal. Für 0,6 g demnach 6 Cal. Selbst wenn wir annehmen, daß die doppelte Menge Glykogen hydrolysiert sei, also

eine Hydrolysenwärme von 12 Cal entstehen würde, so wird sich dadurch die ungedeckte Wärme nur auf etwa 100 Cal verringern. Wahrscheinlich findet bei der Anoxybiose des Frosches auch eine Eiweißhydrolyse statt, die allerdings experimentell noch nicht untersucht ist. Aber auch die Wärmetönung dieses Prozesses würde von ähnlicher Größenordnung wie die der Hydrolyse des Glykogens sein und daher den ungedeckten Betrag wohl kaum wesentlich unter 100 Cal herabdrücken. Nehmen wir entsprechend *Meyerhofs* Hypothese die Entionisierungswärme des Eiweißes in der Muskelzelle nicht zu 137, sondern zu 197 pro Gramm Milchsäure an, so ergibt die Rechnung:

Wärmetönung beim Übergang von Glykogen in Milchsäure . .	157 Cal
Verdünnungswärme der Milchsäure	14 „
Neutralisationswärme von 0,5 g Milchsäure	10 „
Entionisierungswärme von 0,5 g Milchsäure	100 „
Hydrolysenwärme des Glykogens (und Eiweißes)	20 „
Summe	301 Cal.

Demnach bleiben auch dann noch 60 Cal ungedeckt. Es gibt wohl kaum eine andere Möglichkeit, als anzunehmen, daß bei der Anoxybiose des ganzen Tieres außer dem Übergange von Glykogen in Milchsäure und der hydrolytischen Spaltung des Glykogens (und Hydrolyse von Eiweißkörpern ?) noch andere chemische Prozesse vorkommen, welche mit positiver Wärmetönung einhergehen. Diese chemischen Prozesse zu suchen, muß späteren Arbeiten überlassen bleiben.

Zusammenfassung.

Bei der Anoxybiose hungernder Frösche werden bei 17,5° und zwei- bis dreistündiger Versuchsdauer pro 100 g Tier in den Monaten Januar und Februar 0,0975 g Milchsäure und 0,1024 g reduzierende Substanz sowie 24,8 mg Kohlensäure gebildet. In den Monaten Mai bis Juli 0,1375 g Milchsäure und 0,08 g reduzierende Substanz. Die gleichzeitige Kalorienproduktion beträgt dabei 49,3 Cal. Die Kohlensäureausgabe 33,9 mg. Der Quotient Kalorien pro Milligramm Kohlensäure ist nahezu derselbe wie bei früheren Versuchen bei 0° (1,48 gegen 1,60). Die Wärmeproduktion ist in der ersten Stunde am größten, sinkt dann rasch ab, entspricht aber erst von der dritten Stunde an etwa den Werten, wie sie nach *Meyerhof* der ruhende herausgeschnittene Muskel bei der Anoxybiose im September bei 22° liefert. Der zeitliche Verlauf der Wärmeproduktion ist bei 17,5° dem bei 0° ähnlich, nur erfolgt bei der höheren Temperatur die Abnahme der Wärmeproduktion schneller. Die anoxybiotische Kalorienproduktion beträgt für 100 g Tier in der ersten Stunde 32,8 Cal, in der zweiten 16,3 Cal, in der dritten 6,5 Cal.. Der Quotient Kalorien pro Gramm Milchsäure beträgt

361 ± 20 Cal und ist fast derselbe wie in *Meyerhofs* Versuchen am herausgeschnittenen Muskel. Da aber in *Meyerhofs* Versuchen nur eine unbedeutende Kohlensäureaustreibung stattfand, während beim ganzen Tiere die Hälfte der Kohlensäure abgegeben wird, welche von der Milchsäure aus Bicarbonat freigemacht werden könnte, so werden bei der Anoxybiose des ganzen Tieres etwa 100 Cal pro Gramm Milchsäure gefunden, für deren Entstehung kein Grund angegeben werden kann. Es ist daher die Möglichkeit nicht auszuschließen, daß bei der Anoxybiose des ganzen Tieres außer der Bildung von Milchsäure aus Glykogen und der Hydrolyse von Glykogen und Eiweißkörpern noch ein anderer chemischer Prozeß mit merklicher positiver Wärmetönung vorkommt.

Das Verhalten des Glykogens der Frösche bei Anoxybiose und Restitution. IV.

Von

E. J. Lesser.

(Aus dem Laboratorium der städtischen Krankenanstalten in Mannheim.)

(Eingegangen am 27. Juni 1923.)

Innerhalb der Untersuchungsreihe, in der *O. Meyerhof* die chemischen Vorgänge bei der Muskelkontraktion und Erschlaffung aufgeklärt hat, beschäftigt sich dieser ausgezeichnete Forscher auch mit Versuchen, welche ich früher über das Verhalten des Glykogens der Frösche bei Anoxybiose und Restitution angestellt habe. Er kommt[1]) aber, von vorgefaßten Meinungen ausgehend, zu falschen Schlußfolgerungen. Er glaubt nämlich, ohne darüber Versuche angestellt zu haben, daß die Milchsäurebildung und der Glykogenschwund, wie er im herausgeschnittenen Muskel bei Anoxybiose zur Beobachtung kommt, quantitativ mit dem am ganzen Tiere unter gleichen Bedingungen stattfindenden übereinstimmen müsse. Daher nimmt er an, daß der von mir beobachtete anoxybiotische Glykogenschwund sich zum ganz überwiegenden Teile in der Leber abspiele. Nun hatte ich aber in der von *Meyerhof* angezogenen Arbeit genau das Gegenteil experimentell erwiesen[2]). Durch getrennte Verarbeitung der Lebern und des übrigen Körpers wurde nachgewiesen, daß Anoxybiose sowohl das Glykogen der Körper, als auch das der Leber zum Schwinden bringt. Die Mittelwerte der dort angegebenen Zahlen (zusammen 30 Tiere nach Ausschaltung eines Versuches, der mit zu geringer Tierzahl ausgeführt war) zeigen, daß bei einem Gesamtverlust von 1,41 g Glykogen 0,52 g in den Lebern der Tiere und 0,89 im Körper der Tiere verschwinden. Pro 100 g Tier verschwinden 0,162 g Glykogen, davon 0,0595 in der Leber und 0,102 im Körper. Der größere Teil des Glykogens verschwindet also im Muskel, denn außer dem Ovarium und der Leber kommen als Organe, in denen erhebliche Mengen Glykogen enthalten

[1]) Pflügers Arch. **185**, 20, 1920.
[2]) Zeitschr. f. Biol. **56**, 480, 1911.

sind, nur noch die Muskeln in Frage. Es ist also genau umgekehrt, als *Meyerhof* auf Grund vorgefaßter Meinungen annimmt. *Meyerhof* sagt ferner: „Die Annahme", daß der herausgeschnittene Muskel sich quantitativ ganz anders hinsichtlich des anoxybiotischen Glykogenschwundes verhalte als der Muskel im lebenden Tiere, „sei unwahrscheinlich". Nun habe ich[1]) aber bereits vor 10 Jahren den anoxybiotischen Glykogenschwund herausgeschnittener Organe mit dem im ganzen lebenden Tiere verglichen und dabei gefunden, daß im Winter sich durch Anoxybiose, welche am ganzen Tiere in jeder Jahreszeit wirkt, am herausgeschnittenen Muskel und der herausgeschnittenen Leber eine deutliche Vermehrung des Glykogenschwundes nicht erzielen läßt. Ich habe also durch das Experiment nachgewiesen, daß dasjenige, was *Meyerhof* eine unwahrscheinliche Annahme nennt, tatsächlich besteht. Ich kann daher zu meinem Bedauern diesem auch von mir hochgeschätzten Forscher den Vorwurf nicht ersparen, daß er über meine Arbeiten ein vollständig falsches Urteil abgegeben hat, obwohl er nur eine, und auch diese nur zum Teil gelesen haben kann. Infolgedessen hat *Meyerhof* auch nicht bemerkt, daß zwischen seinen Arbeiten am herausgeschnittenen Muskel und den meinigen am ganzen Tiere sich ein anderer Widerspruch findet, der aufgeklärt werden mußte. *Meyerhof* findet in der Restitution eine Resynthese von Glykogen aus Milchsäure im herausgeschnittenen Muskel, *die völlig unabhängig von der Jahreszeit ist. Regelmäßig* beobachtete ich eine solche am ganzen Tiere *nur* in den Sommermonaten, während sie im November vollständig fehlte. Im Mittel der in der Zeit von November bis Mai angestellten Versuche betrug bei einer anoxybiotischen Abnahme des Glykogens von 0,17 g pro 100 g Tier die Resynthese des Glykogens in der Restitution nur 0,04 g pro 100 g Tier. Von besonderer Wichtigkeit aber sind zwei spätere Versuche[2]), bei denen ich die Fehlergrenze der Glykogenbestimmung experimentell bestimmt habe. Damals ergab sich, daß 100 g Tier (25. Juni 1912) vor dem Versuche enthalten $0{,}448 \pm 0{,}012$ g Glykogen, nach $1^3/_4$ Stunden Anoxybiose bei 22° 0,246 g Glykogen, nach 14 Stunden Restitution bei 22° 0,440 g Glykogen. Sie haben demnach in der Anoxybiose $0{,}202 \pm 0{,}012$ g Glykogen verloren und in der Restitution $0{,}194 \pm 0{,}012$ g Glykogen wieder gewonnen. Am 15. November 1911 ergab sich für 100 g Tier vor dem Versuche ein Glykogengehalt von $1{,}295 \pm 0{,}015$ g, nach $5^1/_2$stündiger Anoxybiose bei 14° ein Glykogengehalt von 1,168 g und nach 17stündiger Restitution bei 14° ein Glykogengehalt von 1,181 g. Demnach hatten die Tiere durch Anoxybiose verloren 0,127

[1]) Diese Zeitschr. 54, 236, 1913.
[2]) Zeitschr. f. Biol. 60, 388, 1913.

$\pm$ 0,015 g Glykogen und in der Restitution gewonnen 0,013 $\pm$ 0,015 g Glykogen. Ich habe damals diese Differenzen scharf hervorgehoben, ebenso wie ich im Gegensatz zu meiner ersten Mitteilung (a. a. O., S. 391) erklärt habe, *daß ein Teil des in der Restitution synthetisierten Glykogens „aus anderem Material als aus Traubenzucker gebildet worden ist*". Um den Widerspruch zwischen meinen Ergebnissen am ganzen Tiere und denen *Meyerhofs* am herausgeschnittenen Muskel aufzuklären, habe ich zwei neue Versuche, den einen im November, den anderen im Juni angestellt, bei denen genau wie ich es früher beschrieben habe, verfahren wurde. Nur wurden die Tiere jetzt vor der Glykogenanalyse durch Kopfabschneiden und Rückenmarkzerstören getötet, dann sofort die Leber präpariert und diese in einen in Eis stehenden gewogenen Kolben gegeben. Der Rest des Tierkörpers kam dann sofort in 100° warme Kalilauge von 60 Proz. Waren alle Lebern präpariert, so wurde der Kolben rasch gewogen, die Leber mit der vorgeschriebenen Menge heißer Kalilauge übergossen und auf Glykogen analysiert. Tötung der Tiere und Präparation der Lebern dauerte 35 bis 50 Minuten. Der erste Versuch wurde am 14. bis 16. November 1921 gemacht. Die Tiere waren am 17. Oktober gefangen und seitdem im ungeheizten Raume ohne Nahrung gehalten. 56 weibliche Eskulenten wurden in vier Partien zu je 14 Tieren geteilt, welche 516, 517, 517 und 518 g wogen. In dieser Arbeit sind im Gegensatz zu früher alle Glykogenwerte in Traubenzucker ausgedrückt, so wie sie durch die Hydrolyse erhalten wurden. Die erste Gruppe, unbehandelte Tiere, enthielt in 100 g Tier 5,74 g Leber, darin 0,9872 g Glykogen und im Restkörper 0,5812 g Glykogen. Die Gruppe 2, unbehandelte Tiere, enthielt in 100 g Tier 5,396 g Leber, darin 0,9458 g Glykogen. Im Restkörper 0,6016 g Glykogen. Damit ergibt sich für die unbehandelten Tiere in 100 g Tier 5,568 $\pm$ 0,172 g Leber mit 0,9665 $\pm$ 0,0207 g Leberglykogen und 0,5914 $\pm$ 0,0102 g Körperglykogen. Gruppe 3 und 4 wurden bei 13,5 bis 14° 3 Stunden lang anoxybiotisch gemacht, dann waren alle Tiere gelähmt. Gruppe 3 wird dann sofort auf Glykogen verarbeitet, während Gruppe 4 22 Stunden an der Luft gelassen und erst dann auf Glykogen verarbeitet wird. Äußerlich tritt Erholung der Tiere in 1½ bis 2 Stunden dabei ein. Gruppe 3, Anoxybiose, enthält in 100 g Tier 5,271 g Leber, darin 0,8540 g Glykogen und 0,4265 g Glykogen im Restkörper. Es haben also 100 g Tier durch Anoxybiose verloren 0,297 $\pm$ 0,172 g Leber und 0,1125 $\pm$ 0,0207 g Leberglykogen und 0,1649 $\pm$ 0,0102 g Körperglykogen. Gruppe 4, Anoxybiose und Restitution, enthält in 100 g Tier 4,644 g Leber, darin 0,723 g Leberglykogen und im Restkörper 0,5696 g Glykogen. In der Restitution hat demnach 100 g Tier verloren 0,627 $\pm$ 0,172 g Leber und 0,0817 $\pm$ 0,0207 g Leberglykogen, der übrige Körper aber hat 0,1431 $\pm$ 0,0102 g

Glykogen gewonnen. Das Gesamtergebnis ist: 100 g Tier enthalten 1,558 ± 0,0309 g Glykogen. Sie verlieren durch Anoxybiose 0,2774 ± 0,0309 g Glykogen und nehmen in der Restitution 0,0614 ± 0,0309 g zu. Die Zunahme in der Restitution ist also mit einem Fehler von 50 Proz. behaftet. Sie beträgt nur 3,7 Proz. des anfänglichen Glykogengehaltes und 22 Proz. der anoxybiotischen Glykogenabnahme. Ein entsprechender Versuch wurde am 20. Juli 1922 angestellt. 60 weibliche Eskulenten, die vor 14 Tagen geliefert waren, wurden in je vier Gruppen geteilt, welche 469, 477, 480 und 473 g wogen. Die erste und die vierte Gruppe wurden mit einem Intervall von 24 Stunden analysiert. Die Gruppe 1 enthielt in 100 g Tier 2,274 g Leber, darin 0,050 g Glykogen. Im Körper 0,3924 g Glykogen. Die Gruppe 4 enthielt in 100 g Tier 2,42 g Leber, darin 0,0481 g Glykogen, im Körper 0,3343 g Glykogen. Als Mittelwert ergibt sich in 100 g Tier 2,347 ± 0,073 g Leber, darin 0,0493 ± 0,0012 g Glykogen. Im Körper 0,3634 ± 0,0311 g Glykogen. Gruppe 2 enthielt nach 1 Stunde und 10 Minuten Anoxybiose bei 18^0 (sämtliche Tiere völlig gelähmt) in 100 g Tier 2,356 g Leber, darin 0,01446 g Glykogen, im Körper 0,1749 g Glykogen, durch Anoxybiose hatten die Tiere bei unverändertem Lebergewicht demnach verloren 0,0348 ± 0,0012 g Leberglykogen und 0,1885 + 0,0031 g Körperglykogen. Gruppe 3 blieb nach 1 Stunde und 10 Minuten Anoxybiose bei 18 bis 20^0 24 Stunden an der Luft, wurde dann auf Glykogen analysiert. Nach 1½ Stunden traten bei fast allen Tieren Kehldeckelbewegungen auf, doch blieben sie, auf den Rücken gelegt, in dieser Stellung liegen. Nach 3 Stunden sitzen alle, bis auf zwei, in normaler Haltung und atmen stark. Am nächsten Morgen verhalten sich alle völlig normal. Die Analyse ergab in 100 g Tier 2,289 g Leber, darin 0,0148 g Glykogen und 0,3344 g Körperglykogen. Demnach hatte in der Restitution auf 100 g Tier die Leber zugenommen um 0,003 ± 0,0012 g Glykogen, der Körper um 0,1595 ± 0,0311 g Glykogen. Die Gesamtänderung pro 100 g Tier, in denen am Anfang des Versuches 0,4127 ± 0,0323 g Glykogen enthalten waren, beträgt in der Anoxybiose eine Abnahme um 0,2233 ± 0,0323 g Glykogen und eine Zunahme in der Restitution von 0,1628 ± 0,0323 g Glykogen.

In der Tabelle I sind die beiden Versuche noch einmal übersichtlich zusammengestellt, alle Zahlen beziehen sich auf 100 g Tier. Diese beiden neuen Versuche stimmen mit den früher angestellten gut überein. Es ergibt sich wiederum, daß bei Anoxybiose des ganzen Tieres der größere Teil des Glykogens in den Muskeln schwindet. Im Mittel der drei früheren Winterversuche gingen 30 Proz. der gesamten Glykogenabnahme in der Leber verloren; jetzt fand sich im Winterversuche, daß 40 Proz. in der Leber zum Verlust kamen, während

Tabelle I.

	Änderung des Glykogens in 100 g Tier			Datum
	Leber g	Körper g	Leber u. Körper g	
Änderung durch Anoxybiose	— 0,1125	— 0,1649	— 0,2774	14—16. XI. 1921
Änderung durch Restitution	— 0,0817	+ 0,1431	+ 0,0614	
Änderung durch Anoxybiose	— 0,0348	— 0,1885	— 0,2233	20—21. VI. 1922
Änderung durch Restitution	+ 0,0033	+ 0,1595	+ 0,1628	

bei der glykogenarmen Sommerleber sogar nur 15 Proz. des gesamten Glykogenverlustes in der Leber verschwinden. *Man sieht also ebenso wie in den früheren Versuchen, daß genau das Gegenteil der Meyerhofschen Deutung meiner Versuche in Wirklichkeit vorhanden ist.* Zwischen meinen und *Meyerhofs* Befunden über die Neubildung des Glykogens in der Restitution besteht jetzt keine Differenz mehr. Die Resynthese des Glykogens im Muskel bei der Restitution ist in der Tat ganz unabhängig von der Jahreszeit. *Diese Glykogenzunahme im Muskel wird aber im Winter dadurch verdeckt, daß dann das Leberglykogen auch in der Restitution weiter schwindet. Dadurch wird die Gesamtänderung des Glykogens in der Restitution so verkleinert, daß sie den Fehlergrenzen meiner Versuchsanordnung sehr nahe kommt,* in manchen Fällen in sie fällt. Dagegen ergibt der Vergleich des anoxybiotischen Glykogenverlustes mit der mittleren Milchsäure- und Zuckerbildung (wie sie in der vorausgegangenen Abhandlung ermittelt wurde), daß bei der Anoxybiose des ganzen Tieres im Muskel nicht nur so viel Glykogen schwindet, als Milchsäure entsteht, sondern mehr. Es wird außerhalb der Leber mehr Glykogen hydrolysiert, als in Milchsäure übergeführt wird. Der Mittelwert der Sommerversuche ergibt eine Milchsäurebildung von 137,5 mg und eine Zuckerbildung von 80,4 mg pro 100 g Tier in $2\frac{1}{4}$ Stunden. Daraus berechnet sich ein Glykogenverlust (als Glucose berechnet) von 218 mg pro 100 g Tier, davon sind 37 Proz. Traubenzucker geworden. Da wir sahen, daß im Sommerversuche 15 Proz. des gesamten Glykogenverlustes auf die Leber kommen, so ergibt sich, daß ein beträchtlicher Teil der gefundenen anoxybiotischen Zuckerbildung nicht in der Leber, sondern in den Muskeln vor sich gegangen ist. Das gleiche ergibt sich für die Winterversuche. Hier berechnet sich auf Grund der Ermittlung der Milchsäure- und Zuckerbildung, daß mindestens 50 Proz. des gesamten Glykogenverlustes Zucker geworden sind, während nur 40 Proz. des gesamten Glykogenverlustes auf die Leber kommen (dabei ist die wahre Zuckerbildung noch erheblich größer, denn in diesen Versuchen ist nur die direkte

Reduktion ermittelt worden, ohne vorher zu hydrolysieren). Unter gewissen Bedingungen wird auch am herausgeschnittenen Muskel beobachtet[1]), daß mehr Glykogen hydrolysiert wird, als Milchsäure entsteht. Es ist also keineswegs so, daß im Muskel die Hydrolyse des Glykogens und die Milchsäurebildung immer gleichgroß sein müssen. Im ganzen sieht man, daß qualitativ die Vorgänge im herausgeschnittenen Organ dieselben sind wie im lebenden Tiere, quantitativ aber finden sich sehr beträchtliche Unterschiede, wie ich das schon vor Jahren dargelegt habe. Es ist nicht angängig, ohne Versuche darüber anzustellen, quantitativ die Vorgänge im herausgeschnittenen Organ mit dem ganzen lebenden Tiere einfach gleichzusetzen. Falls sich im Experiment quantitative Differenzen finden, dürfen diese nicht unberücksichtigt bleiben. Es muß vielmehr versucht werden, diese Differenzen aufzuklären, wie das in der vorausgehenden Abhandlung begonnen ist.

---

[1]) *Parnas* und *Wagner*, diese Zeitschr. **61**, 403.

Studien über die physiologische Bedeutung des Titans im Pflanzenorganismus.

Von

Antonín Němec und Václav Káš.

(Aus der biochemischen Abteilung der staatlichen Versuchsanstalt für Pflanzenproduktion in Prag.)

(*Eingegangen am 27. Juni 1923.*)

Mit 2 Abbildungen im Text.

Über die physiologische Funktion des Titans im pflanzlichen Organismus ist bis heute so gut wie nichts bekannt, obschon dieses Element eine wichtige Komponente der Erdrinde darstellt. In der Reihe der Elemente, welche die Erdkruste bilden, steht Titan an der zehnten Stelle. Sein Prozentgehalt in der Erdrinde beträgt nach *F. W. Clarke* 0,33 Proz. und ist größer als der des Kohlenstoffs, Wasserstoffs und Phosphors.

In Ackerböden ist Titan ganz allgemein verbreitet. Sein Vorkommen in verschiedenen Böden verfolgten *Pellet* und *Fribourg*[1]) sowie später *Robinson*, *Steinkoenig* und *Miller*[2]), die fanden, daß Tonböden den höchsten Titangehalt aufweisen. Neuestens befaßte sich *Geilmann*[3]) eingehend mit der Frage der Verbreitung des Titans in Böden und Pflanzen, und an der Hand seines reichen Versuchsmaterials fand er als Mittel für Ackerboden einen Gehalt von 0,3 bis 0,6 Proz. TiO_2. Der Höchstgehalt des Titans nach *Geilmann* war im schweren Tonboden 1,008 Proz. TiO_2; *Robinson* fand mit seinen Mitarbeitern im Louisa-Ton 1,51 Proz. TiO_2. *Geilmann* beobachtete im Titangehalt verschiedener Böden eine gewisse Gesetzmäßigkeit: am titanreichsten sind die Tonböden; im Lehmboden ist ein geringerer Gehalt vorhanden. Noch geringere Titangehalte zeigen die Sand- und Kalkböden, während in reinem Sand und Kalk sehr wenig Titan vorhanden ist. Als völlig titanfrei konnte keiner der untersuchten Böden betrachtet werden.

Das Vorkommen des Titans in Pflanzenorganen ist schon von älteren Autoren (z. B. *Aderholdt*, *Wait*, *Baskerwille*) nachgewiesen worden. In neuerer Zeit untersuchten *Robinson* (l. c.) mit seinen Mitarbeitern sowie

---

[1]) *Pellet* und *Fribourg*, Bull. Assoc. Chim. Sucr. **23**, 67, 1905.

[2]) *W. O. Robinson*, *L. A. Steinkoenig* und *C. F. Miller*, U. S. Dept. of Agric. Bull., Nr. 600, Washington D. C. 1917.

[3]) *Geilmann*, Journ. f. die Landwirtschaft **68**, 107, 1920.

Geilmann (l. c.) eine ganze Reihe von Kulturpflanzen und konnten in allen Fällen den Nachweis von Titan erbringen. *Robinson* untersuchte Pflanzenproben, welche direkt vom Felde genommen wurden, und fand Spuren bis 0,017 Proz. TiO_2 in der lufttrockenen Substanz. Für eine Reihe von verschiedenen Pflanzen, die alle auf demselben Boden (mit einem Titangehalt 0.336 Proz. TiO_2) gewachsen waren, konnte *Geilmann* einen sehr schwankenden Titangehalt in der Pflanzenasche feststellen. Der höchste Titangehalt wurde im Kartoffelkraut gefunden; Kartoffelknollen enthalten dagegen nur sehr geringe, aber nachweisbare Titanmengen [1]). Man kann die Pflanzen nach ihrem Titangehalt in artverwandte Gruppen zusammenstellen. Die Hülsenfrüchte bilden eine Gruppe mit annähernd gleichem Titangehalt, ebenso auch Weizen und Hafer; dagegen muß man die Wiesengräser in eine besondere Gruppe einreihen, welche einen höheren Titangehalt als die Halmfrüchte aufweist.

Die physiologische Bedeutung des Titans in der Pflanze wurde bisher experimentell noch nicht näher untersucht.

Sämtliche Vermutungen und Schlußfolgerungen, welche man über die Teilnahme des Titans an den Stoffwechselprozessen bei der Ernährung des pflanzlichen Organismus ausgesprochen hat, wurden nur von den Ergebnissen abgeleitet, welche bei den Studien über die Verbreitung dieses Elementes in verschiedenen Pflanzenorganen gewonnen waren. So hat *Traetta Mosca* [2]) die erste Annahme über die physiologische Aufgabe des Titans in Tabakblättern ausgesprochen. Er betrachtet Titan als einen für das Leben der Pflanze wichtigen Aschenbestandteil und glaubt, daß es an dem Stoffwechsel der Pflanzenzellen als Oxydationskatalysator teilnimmt. *Geilmann* (l. c.) beobachtete, daß Titan vorwiegend in den Assimilationsorganen angehäuft wird, eine Tatsache, die eine weitere Stütze für die Annahme einer oxydations-katalytischen Wirkung des Titans bei den Assimilationsprozessen darstellt.

Versuche über den Einfluß von Titandüngung auf die Entwicklung und Zusammensetzung der Pflanzen.

In unseren Versuchen mußte vor allem festgestellt werden, ob die Pflanzen auf eine Titandüngung reagieren, und wieweit die Intensität der Resorption des Titans durch die Pflanze von dem Titangehalte des Bodens abhängt. Zu diesem Zwecke wurden Gefäßversuche mit Senf, Erbsen und Luzerne über die Wirkung der steigenden Düngergaben von Titansalzen im guten sandigen Lehmboden angestellt. Als Düngersalze haben wir zu dem Senfversuche das wasserunlösliche Natriumtitanat, zu den Erbsen- und Luzerneversuchen das wasserlösliche titancitronensaure Natrium $(TiO)Na_2 . C_6H_6O_7 . H_2O$ verwendet. Nach der erfolgten Ernte wurden die Pflanzen durch Abspülen im Wasserstrome gründlich von anhaftendem Boden und sonstigen Verunreinigungen befreit, zwischen Filtrierpapier getrocknet und in reinen Papiersäcken bis zur Analyse aufgehoben.

---

[1]) *Headden*, Journ. Amer. Agron. **13**, 162, 1921.

[2]) *T. Mosca*, Gazz. chim. ital. **43**, II, S. 437, 1913.

Die Bestimmung des Titans in der Pflanzenmasse wurde auf kolorimetrischem Wege nach der Methode von *A. Weller* ausgeführt (die eingehende Beschreibung der betreffenden Methoden siehe bei *Geilmann*, l. c., S. 109ff. und 118). Die Gelbfärbung der zu prüfenden Lösung wurde mit der der Testlösung (zu welcher die gleiche P_2O_5-Menge wie in der analytischen Probe zugesetzt wurde) im *Walpole*schen Kolorimeter mit blauer, mattierter Glasscheibe verglichen.

Versuche mit Senf (Sinapis alba).

In diesem Versuche wurde der Boden mit steigenden Mengen Natriumtitanat ($Na_2O.TiO_2$) gedüngt. Das Salz wurde den betreffenden Gefäßen zu je 0,005 g, 0,01 g, 0,05 g und 0,5 g in Wassersuspension zugesetzt und nach drei Tagen jedes Gefäß (welches 25 kg Boden faßte) mit je 2 g Senf besät.

Schon im ersten Entwicklungsstadium wurde der Unterschied zwischen den Kontroll- und Titanpflanzen bemerkbar, welcher sich hauptsächlich in der größeren Assimilationsfläche der gebildeten Blätter und in ihrer saftigeren grünen Farbe äußerte. Die mit Titan gedüngten Pflanzen gelangten gegenüber den Kontrollpflanzen frühzeitiger zur Blüte. Nach 37 Vegetationstagen, zu einer Zeit, wo die Kontrollpflanzen in der Vollblüte standen und wo in den gedüngten Gefäßen die Pflanzen schon teilweise verblüht waren, wurden die Senfpflanzen abgeerntet.

Die Ernteergebnisse sowie die Resultate der Analysen der Pflanzen sind in der folgenden Tabelle I angeführt:

Tabelle I.

Titandüngung Natriumtitanat in	Gewicht[1]) der lufttrockenen Substanz	Trockensubstanz in d. lufttrockenen Pflanzen	Asche in der Trockensubstanz	P_2O_5		TiO_2		TiO_2 in 25 g lufttrockener Substanz
				in der Trockensubstanz	in der Asche	in der Trockensubstanz	in der Asche	
g	g	Proz.	Proz.	Proz.	Proz.	Proz.	Proz.	mg
—	17,0	88,34	20,90	1,44	6,89	0,0062	0,0290	1,36
0,02	17,4	88,79	21,53	1,34	6,21	0,0097	0,0450	2,15
0,10	20,3	89,76	21,59	1,68	7,72	0,0111	0,0514	2,49
0,50	23,0	90,12	25,58	1,60	6,25	0,0120	0,0471	2,72
1,0	21,7	90,58	21,06	1,45	6,88	0,0070	0,0335	1,60

Unter dem Einfluß der Titandüngung wurde in allen Fällen gegenüber den Kontrollgefäßen ein Mehrertrag erzielt. Die höchste Ernte ergab die vorletzte Titankonzentration (0,5 g Natriumtitanat pro Gefäß). Ein interessantes Bild bieten die Prozentgehalte der Trockensubstanz in den lufttrockenen Pflanzen, welche in direktem Verhältnis mit den Titankonzentrationen steigen. Diese Erscheinung möchten wir mit der kräftigeren Pflanzenentwicklung sowie mit der früheren Reifezeit der Pflanzen unter dem Einfluß der Titandüngung in Zusammenhang bringen. Weiter kann man beobachten, daß parallel

[1]) Mittel von drei Vegetationsgefäßen.

dem Prozentgehalte der Trockensubstanz in der lufttrockenen Masse auch der Prozentsatz der Asche in der Trockensubstanz ansteigt. Der geringere Ernteertrag in der letzten Titankonzentration ist auch von einer Verminderung des Aschengehaltes in den trockenen Pflanzen begleitet. Mit steigender Titandüngung wird allmählich auch die Menge des von den Pflanzen resorbierten Titans erhöht, mit Ausnahme der letzten Konzentration, bei welcher die Menge des aufgenommenen Titans beinahe bis auf den ursprünglichen Gehalt der Kontrollpflanzen



Abb. 1.

zurückgeht. Allgemein kann man beobachten, daß der höchste Ertrag mit der größten Titanresorption zusammenfällt. Die Resorption des Titans durch die Pflanzen hat jedoch seine Grenzen; bei der Konzentration 0,5 g Natriumtitanat pro Gefäß wird bei unseren Versuchsbedingungen der Optimalpunkt erreicht.

Den Zusammenhang zwischen der Düngerkonzentration im Boden, dem Titangehalte in der Trockensubstanz und Asche der Pflanzen sowie der Höhe der Erträge bringt die graphische Darstellung (Abb. 1).

Versuche mit Erbsen (Pisum sativum).

Zu diesem Versuche wurde das wasserlösliche titancitronensaure Natrium, $(TiO)Na_2.C_6H_6O_7.H_2O$, verwendet, welches theoretisch 15,74 Proz. TiO_2 enthält. Das von uns benutzte *Merck*sche Präparat enthielt nach eigener Analyse 12,60 Proz. TiO_2 und 9,84 Proz. H_2O, somit 14 Proz. TiO_2 in der Trockensubstanz.

In der Versuchsreihe wurden folgende Differenzdüngungen gewählt: 2,5 g, 5,0 g und 7,5 g titancitronensaures Natrium, entsprechend 0,35 g, 0,70 g und 1,05 g TiO_2 pro Gefäß. Der Boden wurde mit Lösungen der abgewogenen Salzmengen in je 100 ccm destilliertem Wasser begossen und am nächsten Tage mit zehn angekeimten Erbsensamen besät. Nach 10 Tagen

wurden in jedem Gefäß nur fünf gleichmäßig entwickelte Pflanzen gelassen, die übrigen beseitigt.

Ähnlich wie im Senfversuch zeigten sich die Differenzen schon während der Vegetation: größere Assimilationsfläche und saftigeres Grün der Blätter, frühere Blütezeit der Titanpflanzen gegenüber den Kontrollen. Diese Unterschiede waren bis zur Ernte sehr deutlich merkbar. Nach 38 Vegetationstagen wurde je ein Gefäß von jeder Gruppe photographiert. Die kräftigste Entwicklung der Pflanzen zeigte die vorletzte Konzentration 0,7 g TiO_2 pro Gefäß. Nach dem Abblühen der Pflanzen, insgesamt nach 52 Vegetationstagen, wurden die Pflanzen geerntet.

Die Erträge sowie die chemischen Analysen der Pflanzenasche bringen die Tabellen II und III.

Tabelle II.

Titandüngung Titancitronensaures Natrium g	Gewicht[1]) der lufttrockenen Substanz g	Trockensubstanzgehalt d. lufttrockenen Pflanzen Proz.	TiO_2 in 25 g lufttrockener Substanz mg
—	14,2	88,96	0,59
2,5	15,2	89,42	1,03
5,0	19,8	89,67	1,33
7,5	15,7	88,74	0,89

Tabelle III.

Titandüngung pro Gefäß g	Asche in Trockensubstanz Proz.	Proz. in der Trockensubstanz					Proz. in der Asche				
		SiO_2	$Fe_2O_3 + Al_2O_3$	CaO	P_2O_5	TiO_2	SiO_2	$Fe_2O_3 + Al_2O_3$	CaO	P_2O_5	TiO_2
—	13,24	0,37	1,51	2,29	0,87	0,0027	2,72	11,40	17,30	6,58	0,0204
2,5	13,95	0,44	1,82	2,72	1,06	0,0046	3,15	13,05	19,50	7,60	0,0330
5,0	12,77	0,31	2,02	2,07	1,01	0,0059	2,43	15,82	16,21	7,91	0,0462
7,5	12,09	0,27	1,58	1,86	0,90	0,0040	2,23	13,07	15,38	7,44	0,0331

Aus den Durchschnittszahlen der Tabelle II kann man ersehen, daß die steigenden Titangaben einen günstigen Einfluß auf die Entwicklung der Erbse ausübten. Den größten Pflanzenertrag lieferte die Konzentration 1,05 g TiO_2, während die letzte Titangabe eine Depression im Pflanzenertrage verursachte, die aber im Vergleich zu den Kontrollgefäßen noch einen Mehrertrag vorstellt. Der Trockensubstanzgehalt steigt und sinkt mit den Ernteerträgen wie im Senfversuche. Die Menge des resorbierten Titans steigt mit der wachsenden Titandüngung bis zur vorletzten Konzentration, bei der das Resorptionsoptimum erreicht ist. Die größte Mehrernte ist durch den höchsten Titangehalt der Pflanzen gekennzeichnet.

Die Menge der resorbierten Phosphorsäure und der Sesquioxyde wird parallel dem Titangehalte erhöht bzw. vermindert, während der

[1]) Mittel von drei Vegetationsgefäßen.

Kalk- und Kieselsäuregehalt der Pflanzen mit Ausnahme der ersten Titankonzentration andauernd sinkt.

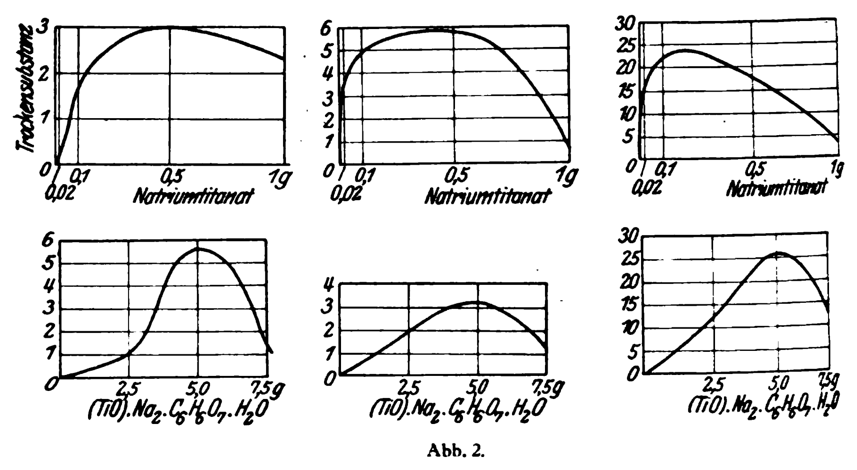


Abb. 2.

Der Zusammenhang der Ernteerträge mit der Titandüngung und mit dem Titangehalte in der Trockensubstanz und Asche ist in Abb. 2 graphisch wiedergegeben.

Versuche mit Luzerne (Medicago sativa).

Nach der Erbsenernte wurde der Boden in den Vegetationsgefäßen aufgelockert und ohne weitere Zufuhr von Titansalzen gleichmäßig mit Luzerne besät. In diesem Versuche wurde also die Nachwirkung des titancitronensauren Natriums auf Luzerne verfolgt.

Während der Vegetationsperiode wurden ähnliche charakteristische Merkmale bei den Titangefäßen wie in den früheren zwei Versuchen festgestellt, besonders was die Farbe der Blätter anbelangt. Nach 93 Tagen wurde die Luzerne abgeerntet.

In der Tabelle IV sind die Resultate der Ernteerträge und der Aschenanalysen aufgeführt.

Auch bei der Nachwirkung wurde bei den Titangefäßen die Ernte deutlich erhöht. Mit dem steigenden Titangehalte der Asche wird auch die Menge des Aluminiumoxyds erhöht. Die steigende Resorption des Titans durch die Pflanze ist von gleichzeitiger Verminderung des Eisengehaltes begleitet. Es scheint, als ob durch die gesteigerte Titanresorption ein anderer Oxydationskatalysator der Pflanze — das Eisen — gewissermaßen verdrängt würde. Der Kalkgehalt wird — ähnlich wie im Erbsenversuche — durch steigende Titanaufnahme vermindert.

Vergleichen wir nun bei den Kontrollgefäßen den Titangehalt der drei zu unseren Versuchen gewählten Pflanzen, so finden wir den höchsten Titanwert bei der Luzerne, 2,59 mg TiO_2 in 25 g, dann folgt der Senf, 1,36 mg TiO_2 in 25 g, und zuletzt Erbse, 0,59 mg TiO_2 in

25 g. Die resorbierte Titanmenge steht im direkten Verhältnis zu der Größe der Assimilationsfläche der Blätter. Je größer also die Assimilationsfläche der Pflanze, desto höhere Titanmengen werden von der Pflanze resorbiert. Für diese Regelmäßigkeit finden wir auch schöne Belege in den Analysen von *Geilmann* (l. c.).

Zusammenfassung.

Unter dem Einfluß von Titandüngung wurden bei Senf, Erbsen und Luzerne bedeutende Mehrerträge erzielt. Bei der Optimalkonzentration des Titans wurde der Senfertrag (durch 0,5 g des wasserunlöslichen Natriumtitanats) um 35,3 Proz., der Erbsenertrag (durch 5 g wasserlöslichen titancitronensauren Natrium, entsprechend 0,7 g TiO_2 pro Gefäß) um 39,4 Proz. erhöht. Bei der Nachwirkung des löslichen titancitronensauren Natriums wurde bei Luzerne (nach Erbsen) ein Mehrertrag von 28,75 Proz. festgestellt.

In den gedüngten Pflanzen war die Menge des resorbierten Titans erhöht: bei Optimalkonzentration enthielten die Titanpflanzen im Vergleich zu den Kontrollen bei Senf um 59,12 Proz., bei Erbsen um 129 Proz. und bei Luzerne (Nachwirkung) um 13,73 Proz. mehr TiO_2.

Der höchste Pflanzenertrag fällt in allen Versuchen mit der höchsten Titanresorption der Pflanze zusammen. Der Prozentgehalt der Trockensubstanz in der lufttrockenen Pflanzenmasse erhöht sich im direkten Verhältnis zu den steigenden Titangaben. Entsprechend der Titanresorption wird auch die Menge der Phosphor- und Kieselsäure erhöht bzw. vermindert, während der Kalkgehalt mit steigenden Titangaben andauernd sinkt.

Der Gehalt an Sesquioxyden in der Trockensubstanz steigt und sinkt mit dem

Tabelle IV.

Titandüngung (zu Erbsen)	Gewicht[1]) der lufttrockenen Substanz	Trockensubstanzgehalt der lufttrockenen Pflanzen	TiO_2 in 25 g lufttrockener Substanz	Asche in d. Trockensubstanz	Proz. in der Trockensubstanz						Proz. in der Asche					
g	g	Proz.	mg	Proz.	SiO_2	Al_2O_3	Fe_2O_3	CaO	P_2O_5	TiO_2	SiO_2	Al_2O_3	Fe_2O_3	CaO	P_2O_5	TiO_2
—	8,0	89,19	2,59	12,69	0,83	1,67	0,30	2,33	1,02	0,0116	6,54	13,16	2,36	18,36	8,04	0,0914
2,5	9,0	90,73	2,95	12,26	1,07	1,82	0,28	1,94	1,21	0,0130	8,72	14,85	2,28	15,82	9,86	0,1060
5,0	10,3	89,67	2,95	12,62	1,37	2,03	0,28	2,02	1,03	0,0130	10,85	16,09	2,22	16,00	8,16	0,1030
7,5	10,0	90,04	2,95	11,96	0,85	1,84	0,22	1,48	1,03	0,0131	7,10	15,38	1,84	12,38	8,61	0,1100

[1]) Mittel von drei Vegetationsgefäßen.

Ernteertrage der Pflanzenmasse. Während aber durch erhöhte Titanresorption der Anteil des Aluminiumoxyds steigt, wird gleichzeitig der Gehalt an Eisenoxyd vermindert, gleich als ob Fe durch das vermehrt resorbierte Titan ersetzt würde.

Die Intensität der Titanresorption durch die Pflanze hängt mit der Größe der gesamten Assimilationsfläche zusammen: Je größer die Assimilationsfläche der Pflanzenblätter, desto höhere Titanmengen werden von den Pflanzenzellen aufgenommen. Diese Beobachtungen stützen die ausgesprochenen Vermutungen über die Beteiligung des Titans an den Assimilationsprozessen der grünen Pflanzen, um so mehr, als wir feststellen konnten, daß der Oxydations- bzw. Reduktionskatalysator der Pflanzenzellen — das Eisen — durch gesteigerte Titanresorption ersetzt werden kann.

Wasserstoffionenkonzentration, Kohlensäuregehalt und Verhältnis von Calcium- zu Kaliumionen im kindlichen Liquor cerebrospinalis.

Von

Joachim Brock.

(Aus der Universitäts-Kinderklinik in Köln.)

(Eingegangen am 27. Juni 1923.)

Die zweifellos engen, wenn auch noch nicht völlig geklärten Beziehungen der Cerebrospinalflüssigkeit zum Nervenparenchym würden es nahe legen, ihre physikalischen und chemischen Eigenschaften bei der kindlichen Spasmophilie, deren Symptome doch überwiegend zentral-nervösen Ursprungs sind, näher zu studieren (während bisher nur diesbezügliche Untersuchungen über die Verhältnisse des Blutes vorliegen). Doch stellt sich einem solchen Beginnen sofort das Fehlen von Normalwerten entgegen, wie sie für das Blut in den letzten Jahren besonders amerikanische Autoren mit Hilfe neuer mikrochemischer Methoden festgelegt haben. Die folgenden Untersuchungen wollen deshalb dazu beitragen, diese Lücke auszufüllen.

Wir gingen dabei von der Vorstellung aus, daß die verschiedenen bei der Spasmophilie gefundenen Veränderungen des intermediären Stoffwechsels dadurch wirken, daß sie eine Entionisierung des Calciums herbeiführen und dadurch den Quotienten $Ca^{\cdot\cdot}/K^{\cdot}$ verschieben. [Die Bedeutung auch pathophysiologischer Änderungen dieses Quotienten ist zwar bisher nur für die vegetative Innervation experimentell erwiesen worden[1]), doch liegt dies wahrscheinlich nur an den technischen Schwierigkeiten der neuromuskulären und besonders zentralen Erregbarkeitsprüfung.] Es galt also zuerst einmal, das Verhalten dieses Quotienten im normalen kindlichen Liquor zu studieren.

Für das Kalium kann man annehmen, daß seine Salze im Liquor total dissoziiert sind, so daß also der Gehalt an K-Ionen dem Gesamt-K-Gehalt entspricht. Anders verhält es sich mit dem Calcium, dessen geringe Löslichkeit in Carbonatlösungen ja bekannt ist. Für die Löslichkeit desselben in Lösungen von freier Kohlensäure und Bicarbonat hat *Rona*[2]) die Formel $k = \frac{[Ca^{\cdot\cdot}][HCO_3']}{[H^{\cdot}]}$ abgeleitet und den Wert der Konstanten k mit *Takahashi* empirisch festgelegt. Man ist demnach in der Lage, wenn

[1]) *Trendelenburg* und *Goebel*, Arch. f. exper. Path. u. Pharm. **89**, 1921; *Zondek*, diese Zeitschr. **121**, 1921.

[2]) Diese Zeitschr. **49**, 370, 1913.

man Wasserstoffzahl und Bicarbonatgehalt einer solchen Lösung kennt, ihren Ca-Ionengehalt rechnerisch zu ermitteln: $[Ca^{\cdot\cdot}] = \frac{[H^{\cdot}]}{[HCO_3']} \cdot k$. Die Anwendung dieser Gleichung auf den dialysablen Teil des Blutkalkes (das sind 70 bis 75 Proz. des Gesamtgehalts) führte die Autoren zu der Vorstellung, daß von diesem nur der durch die obige Formel berechenbare Wert dissoziiert (als $Ca^{\cdot\cdot}$), der größere Rest in übersättigter Lösung vorhanden sein müsse. Man muß zugeben, daß die Anwendung der Gleichung auf physiologische Verhältnisse insofern eine Abstraktion bedeutet, als sie die etwaige Wirkung anderer Faktoren auf die Ionisation des Blutkalkes, wie z. B. die Gegenwart der Anionen HPO_4', die auf Grund klinischer Befunde neuerdings hervorgehoben wird[1]), vernachlässigt. Da jedoch gerade die Möglichkeit dieser Doppelwirkung unseres Wissens noch nicht theoretisch durchgearbeitet ist, wollen auch wir sie hier unberücksichtigt lassen. Wir können dies um so eher, als ja die neuen Untersuchungen von *Brinkmann* und *van Dam*, welche mit ihrer Methode die Ca-Ionen im Dialysat des Serums direkt bestimmen, die Gültigkeit der *Rona*schen Gleichung auch für physiologische Verhältnisse experimentell bewiesen haben[2]). Um mit ihrer Hilfe das Verhalten der Calciumionen im kindlichen Liquor zu studieren, mußten also neben den Calcium-(und Kalium)-Analysen Bestimmungen der Wasserstoffzahl und des Bicarbonatgehalts durchgeführt werden.

I.

Über den Gehalt der menschlichen Spinalflüssigkeit an Alkalien und Erdalkalien liegen in der Literatur nur spärliche Angaben vor, was darin seine Ursache hat, daß die analytischen Methoden, welche es erlauben, mit kleinen Mengen (1 ccm) zu arbeiten, erst aus neuester Zeit stammen.

Kummer und *Minkoff* (Ref. Kongr. Zentr. **22**, 491, 1922) fanden bei Untersuchung von fünf Fällen Ca-Werte, die wenig um 0,0052 g-Proz. schwankten. *Weston* und *Hovard* fanden bei Manisch-Depressiven (Anzahl der Fälle ?) 0,0054 g-Proz. Ca und 0,013 g-Proz. K im Liquor (Ref. Phys. Ber. **15**, 513, 1923). Höhere und stark schwankende Werte gibt *M. Richter-Quittner* in einer jüngst erschienenen Arbeit (diese Zeitschr. **138**) an, doch weichen auch die von dieser Autorin für das Serum angegebenen Zahlen von den sonst in der Literatur vorliegenden völlig ab. Über den kindlichen Liquor habe ich keine Angaben gefunden.

Was unsere Methodik anlangt, so bedienten wir uns, wie auch die vorerwähnten Autoren, der Mikromethoden von *Kramer* und *Tisdall*[3]), nachdem auch uns Vorversuche mit Testlösungen ihre erstaunliche Präzision gezeigt hatten: bei Gehalten von 0,0001 eine Fehlerbreite von nur 1½ Proz.! Es wurden stets Doppelbestimmungen (mit je 1 ccm) ausgeführt, so daß also im ganzen 4 ccm Liquor hierfür benötigt wurden. Es wurde nur wasserklarer Liquor verwendet, der auch mikroskopisch keine artefiziell

[1]) *György*, Jahrb. f. Kinderheilk. 1922.

[2]) Koninkl. Akad. van Wetenschappen te Amsterdam **22**, 762—771. 1920,; engl. Ausgab., zitiert nach Phys. Ber. **8**.

[3]) Ref. betr. Ca: Phys. Ber. **7**, 202 (Nachtr. **10**, 254); betr. K: ebendaselbst S. 581.

beigemengten Erythrocyten enthielt. Trotzdem wurde der Liquor kurze Zeit nach der Entnahme noch elektrisch zentrifugiert.

Die Resultate unserer Ca- und K-Bestimmungen gibt Tabelle I wieder:

Tabelle I.

Nr.	Name	Alter Jahr	Diagnose	Klinisches Verhalten des Liquors	Ca mg-Proz.	K mg-Proz.
1	*F. K.*	10	Neuropathie	Normal	8,0	11,2
2	*H. H.*	9	Idiotie (Lues congenita)	Fast normal	5,6	10,8
3	*G. B.*	8	Meningitis tuberculosa	Liquor wasserklar, 350 Zellen im cmm, Pandy st. Trübung., Kochprb. kl. Kuppe	7,0	14,1
4	*J. B.*	7	Frische Encephalitis lethargica	Fast normal	7,8	12,9
5	*E. K.*	$1^1/_2$	Mäßige Rachitis	Normal	7,7	14,5
6	*W. D.*	1	Hydrocephalus bei Kleinhirn-tuberkulose	Fast normal	8,7	14,2
7	*A. W.*	1	Pachymeningitis haemorrhagica	Normal	7,8	13,0
8	*K. F.*	1	Lues congenitalis latens	„	5,2	13,5
9	*E. S.*	1	Abgelaufene Kinderlähmung	„	6,6	14,1
10	*R. D.*	$^3/_4$	Rachitis	„	5,2	12,9
				Durchschnitt:	6,9	13,1

Da nicht ohne klinische Indikation lumbalpunktiert werden konnte, da andererseits Fälle mit stärkeren entzündlichen Erscheinungen im Liquor sowie alle auch nur latent spasmophilen Kinder von der Untersuchung ausgeschlossen wurden, so war die Auswahl für uns naturgemäß beschränkt. „Ganz gesunde" Kinder konnten wir natürlich nicht untersuchen. Aber es scheint uns aus unserer Tabelle auch gerade hervorzugehen, daß anscheinend die betreffenden Grundkrankheiten sowie die leichten entzündlichen Prozesse an den Meningen in den Fällen 2 bis 6 den Ca- und K-Gehalt des Liquors nicht in einer bestimmten Richtung beeinflussen. Auch die hier in Frage kommenden Altersdifferenzen scheinen keine Unterschiede zu bedingen. Wir fühlen uns infolgedessen berechtigt, die in der letzten Spalte aufgeführten Zahlen (mit alleinigem Vorbehalt wegen der relativ kleinen Anzahl der Fälle) als normale Durchschnittswerte in Rechnung zu setzen: 6,9 mg-Proz. Ca, 13,1 mg-Proz. K.

Dem Werdegang der Untersuchung nach haben zuerst die niedrigen Kaliumwerte des Liquors unsere Aufmerksamkeit erregt. Für das

Serum geben jetzt nämlich *Petow* und *Siebert* bei Vermeidung eines Kaliumaustrittes aus den Erythrocyten (in Übereinstimmung mit den neueren Ergebnissen der beiden amerikanischen Autoren) mit geringer Streuung 17 mg-Proz. als Durchschnittswert an[1]). Da man nun die Kaliumsalze in den Körperflüssigkeiten praktisch wohl als total dissoziiert ansehen kann, so würde der niedrige K-Gehalt im Liquor eine weitgehende und deshalb unwahrscheinliche Verschiebung des Quotienten $Ca^{\cdot\cdot}/K^{\cdot}$ gegenüber dem Serum bedeuten, wenn nicht auch die Menge des dissoziierten Calciums im Liquor entsprechend kleiner wäre. Dieser Gedankengang veranlaßte uns zu den Untersuchungen der Wasserstoffzahl und des Carbonatgehaltes im kindlichen Liquor, über die wir nun berichten wollen.

II.

In der Literatur liegen hierüber nur wenige und voneinander abweichende Angaben vor.

Über kindliche Verhältnisse überhaupt nur in der Acidosearbeit von *Ylppö*[2]). Doch lassen sich dessen Zahlen nicht zum Vergleich heranziehen. Denn er bestimmte die Wasserstoffzahl von Liquor, den er ohne Paraffinschutz stehengelassen hatte, also nach Abdunsten von freier Kohlensäure. Er fand so bei jungen Säuglingen p_H-Werte von 8,4[3]), welche sich bei Zuständen von Bewußtseinstrübung (Intoxikation) nach der sauren Seite hin verschoben. *Parsons* und *Shearer* (Journ. of Physiol. 54, 1920) bestimmten in drei Fällen bei verschiedenen Kohlensäure-Spannungen (elektrometrisch) Wasserstoffzahl und (volumetrisch) Gesamt-CO_2-Gehalt des Liquors und berechneten daraus die betreffenden Werte für die natürlichen Bedingungen. Sie kommen so zu p_H-Werten von 7,12 bis 7,32 und Kohlensäuregehalten von 53 bis 63 Vol.-Proz. (bei 48 bis 64 mm Hg CO_2-Spannung!). Diese Werte gelten für Körpertemperatur. In einer späteren Arbeit [hierüber liegt mir nur ein Referat ohne methodische Angaben vor[4])] haben sie die Wasserstoffzahl im Liquor mit Indikatoren gemessen und in drei Normalfällen p_H-Werte von 7,3 bis 7,4 gefunden bei einer CO_2-Normalität von 0,025 bis 0,031. Die ausführlichsten Angaben (14 Fälle) bringt die Arbeit von *Klothilde Meier*[5]). Sie bestimmte den CO_2-Gehalt des Liquors bei steigenden CO_2-Spannungen mittels des kleinen *Barcroft*schen Differentialmanometers, außerdem ermittelte sie in einer unter Paraffinschutz aufgefangenen Probe die Wasserstoffzahl nach der Methode von *Sörensen* (Vergleich mit Phosphatpuffergemischen unter Verwendung von Neutralrot als Indikator). Zwei von ihr als „Norm" hingestellte Fälle hatten Wasserstoffzahlen von 7,33 und 7,38 und CO_2-Gehalte von 52,3 bzw. 53,4 Vol.-Proz. bei 39 mm CO_2-Spannung. Doch findet sie in einigen klinischen Fällen (die aber für die hier in Betracht kommenden Verhältnisse höchstwahrscheinlich nicht als pathologisch gelten können) auch viel alkalischere

[1]) Klin. Wochenschr. 1922, S. 2172 und persönliche Mitteilung.
[2]) Zeitschr. f. Kinderheilk., Orig. 14, 1916.
[3]) Denselben Wert fanden auch wir kolorimetrisch in ungeschütztem Liquor.
[4]) Phys. Ber. 9, 550, 1922.
[5]) Diese Zeitschr. 124, 137.

Werte, so in einem Fall von beginnender Tabes: p_H 7,58, CO_2-Gehalt 57,6 Vol.-Proz. bei 25 mm CO_2-Spannung. Überhaupt erscheint uns in diesen Arbeiten das große Schwanken der p_H-Werte bemerkenswert, gegenüber dem außerordentlich konstanten Verhalten, welches wir gefunden haben.

Was unsere Methodik anlangt, so bedienten wir uns zur Feststellung der H-Ionenkonzentration im Liquor des m Nitrophenols. Wir stellten uns aus der von den „Vereinigt. Fabriken f. Laboratoriumsbedarf" bezogenen Substanz, welche nur helle Kristalle enthielt[1]), „Stammlösung" und „verdünnte Lösung" selber her und setzten mit letzterer nach dem von *Michaelis* abgebildeten Diagramm (vgl. Praktikum, 1. Aufl., S. 34) die p_H-Reihe an. Als Differenz zwischen den einzelnen Gläschen wählten wir den Betrag von 0,05. Mit den Testlösungen wurden dann große Röhrchen für das käufliche Komparatorgestell, sowie kleine Röhrchen, die in ein diesem nachgebildetes kleines Modell paßten, gefüllt. Die von *Leitz* fertig bezogenen p_H-Röhrchen erwiesen sich dabei als etwas zu blaß (und ergaben deshalb um 0,1 zu alkalische Werte). Die von uns hergestellten Röhrchen prüften wir dann noch durch Vergleich mit Phosphatpuffergemischen, die wir nach der neuesten Vorschrift herstellten[2]) und fanden die geringe Abweichung von 0,025 (um welchen Betrag unsere Röhrchen blasser waren).

Die Entnahme des Liquors zur p_H-Messung geschah in der Weise, daß ein mit Paraff. liquid. gefüllter kleiner Schlauch, der am anderen Ende mit einem fein ausgezogenen Glasröhrchen armiert war, über die laufende Lumbalkanüle gestülpt wurde und so der Liquor in einer kleinen Eprouvette mit einer Marke bei 1,8 (deren Weite genau der der kleinen p_H-Röhrchen entsprach) aufgefangen wurde. Bei einem leicht spielenden Hahn der Lumbalkanüle läßt sich der Meniskus des Liquors leicht genau auf die Marke einstellen. Nach Abkühlung auf Zimmertemperatur wurden dann mit einer Meßpipette 0,3 der Indikatorstammlösung unter das Paraffin zugegeben und nun verglichen, bis das farbgleiche Röhrchen gefunden war. Zu diesem Zwecke wurde stets auf zweierlei Weise vorgegangen. Erstens Vergleich der Röhrchen in auffallendem Licht gegen weißen Hintergrund. Zweitens Vergleich im kleinen Komparatorgestell in durchfallendem Licht durch Blauglas hindurch. Auf diese Weise ließ sich stets eine sichere Entscheidung herbeiführen. Ergab der Vergleich einen zwischen zwei Nachbarröhrchen (z. B. 7,50 und 7,55) liegenden Wert, so wurde interpoliert und je nachdem 7,52 oder 7,53 angenommen.

Zur Kohlensäurebestimmung in dem (auch unter Paraffin aufgefangenen) Liquor benutzten wir anfangs das kleine *Barcroft*sche Differentialmanometer, wobei wir hinsichtlich der Technik den Angaben von *H. Straub* und *Kl. Meier*[3]) folgten. Dem großen Vorteil, daß man dabei mit Mengen von 0,1 arbeitet, steht (wenigstens für uns) der Nachteil gegenüber, daß es auch nach mühseliger Einübung der Technik und Ausschaltung aller Fehlerquellen nicht in allen Fällen gelingt, eine hinreichende Überein-

---

[1]) Vgl. die Bemerkung in der Arbeit von *Michaelis* und *Gyemant*, diese Zeitschr. **109**, 171, 1920.

[2]) Das *Sörensen*sche sekundäre Natriumphosphat von *Kahlbaum* wird vor dem Gebrauch erst 2 Tage im Brutschrank bei 38° nachgetrocknet. Dann soll es genau die Zusammensetzung $Na_2HPO_4 + 2H_2O$ haben. Wir bereiteten daraus mit CO_2-freiem aqua dest. eine m/10 Lösung. Zu abgemessenen Proben von 10 ccm fügten wir dann n/10 HCl nach dem Diagramm von *Sörensen*.

[3]) Diese Zeitschr. **89**, 1918.

stimmung zwischen den verschiedenen Kontrollbestimmungen zu erzielen. Wir wandten uns deshalb, als uns diese bekannt wurde, der titrimetrischen Bestimmung der Kohlensäure zu, die *van Slyke*[1]) kürzlich für das Blutplasma angegeben hat und die nach seiner Angabe in ihren Resultaten den volumetrischen Methoden völlig entspricht. Wie wir uns überzeugen konnten, ist diese für den Liquor besonders geeignete Methode außerordentlich einfach und dabei sicher (die Doppelanalysen stimmen in idealer Weise überein). Gebraucht werden dazu inklusive Kontrollbestimmung 3, wenn man mit halben Dosen arbeitet, 1,5 ccm.

Tabelle II.

Nr.	Name	Alter	Diagnose	Klinisches Verhalten des Liquors	p_H	Gesamter CO_2-Gehalt Vol.-Proz.	CO_2-Spannung errechnet mm
1	*P.Fr.*	11 J.	Neuropathie	Normal	7,55	B 65	27
2	*F.K.*	10 „	„	„	7,55	B 57	24
3	*H.H.*	9 „	Idiotie (congenitale Lues)	Fast normal	7,55	B 61	26
4	*Derselbe*		½ Jahr später	„ „	7,55	0,025 n = 56	24
5	*A.Sch.*	10 M.	Nasendiphtherie	Normal	7,55	0,023 n = 52	22
6	*M.G.*	10 „	Lues congenitalis latens	„	7,53	0,023 n = 52	23
7	*H.F.*	8 „	Bronchitis	„	7,50	0,023 n = 52	24
8	*E.H.*	2 J.	Manifeste Spasmophilie (Mongolismus)	„	7,55	0,027 n = 60	26
9	*L.S.*	1½ „	Rachitis	„	7,50	0,021 n = 47	23
10	*J.B.*	9 M.	Pneumokokkenmeningitis	Liquor leicht getrübt, 1000 Zellen im cmm	7,35	0,017 n = 38	26

In Tabelle II sind nur die Fälle zusammengefaßt, in denen wir Wasserstoffzahl und CO_2-Gehalt bestimmt haben. Was p_H-Messungen allein anlangt, so verfügen wir schon über 18 Fälle und haben, obgleich solche in Bewußtlosigkeit oder Krämpfen darunter waren, nie ein Überschreiten der p_H-Breite 7,50 bis 7,55 gefunden[2]). Dieser Wert bedeutet einen bemerkenswerten Unterschied gegenüber dem Blutserum, in dem die Wasserstoffzahl etwa 7,35 beträgt. Der Liquor weicht also durchschnittlich um 0,17 nach der alkalischen Seite ab.

Wir möchten hier auf eine Unstimmigkeit hinweisen. *Hasselbach*[3]) gibt an, daß unter gleichbleibendem CO_2-Druck bei 18° die Wasserstoffzahl von Bicarbonatlösungen um 0,12, von Serum um 0,1 saurer wäre als bei 38° (während Blut wegen der Pufferwirkung des Hämoglobins keinen

[1]) Studien über Azidosis, XVIII. Journ. of biol. Chem. **52**, 1922; Ref. Phys. Ber. **15**, 259, 1923.

[2]) Mit Ausnahme des Falles von eitriger Meningitis (Nr. 10).

[3]) Vgl. die grundlegende Arbeit dieser Zeitschr. **78**, 1917.

Unterschied zeige). Er findet also, daß bei der niedrigeren Temperatur die geringere Dissoziation der Kohlensäure ihrer stärkeren Absorption in der Lösung nicht ganz die Wage hält. Allerdings führt er an, daß *Michaelis* und *Rona* bei Erwärmung derartiger Lösungen im Elektrodengefäß keinen Unterschied im p_H bei der Gaskettenmessung gegenüber der Zimmertemperatur fanden. Da diese Frage für die Deutung unserer Zahlen wichtig ist, so haben wir sie für den Liquor in mehreren Fällen geprüft, indem wir nach der ersten bei Zimmertemperatur erfolgten Ablesung die (mit Paraffin. liquid. überschichteten und mit Indikator beschickten) Röhrchen auf dem Wasserbade oder im Brutschrank auf 38° erwärmten. Unter Berücksichtigung des Temperaturkoeffizienten[1]) des Indikators konnten wir nie eine Verschiebung des p_H nach der alkalischen Seite hin feststellen. Er blieb sich gleich oder wurde um einen allerdings noch im Bereich des Ablesungsfehlers liegenden Betrag (0,02) sogar nach der sauren Seite verschoben. Dies hat uns veranlaßt, bei unseren Berechnungen mit der *Hasselbach*schen Formel, die sich hier alle auf Zimmertemperatur beziehen, den Wert für p_{k_1} gegenüber 38° nicht um 0,1 (wie *Hasselbach* angibt), sondern um 0,2 höher anzusetzen.

Was die Kohlensäurewerte betrifft, so liegen sie bei den älteren Kindern, die schon ein dem Erwachsenen ähnliches Verhalten zeigen dürften, durchweg etwas höher (Fall 1 bis 4), ein Verhalten, welches also dem im Blutplasma entspricht. Für das uns hier am meisten interessierende Säuglingsalter geben ein Beispiel Fall 5, 6 und 7 mit ihrem übereinstimmenden Wert von 52 Vol.-Proz. Fall 8, 9 und 10 schließlich sind pathologische Fälle, die wir nur des Vergleiches halber anführen: eine mäßige Alkalose bei manifester Tetanie (8), eine mäßige Azidose bei Rachitis (9), und die ganz aus der Reihe fallende eitrige Meningitis (10), die besonderes Interesse gewinnt durch Vergleich mit dem letzten Fall von *Kl. Meier*, einer Meningokokkenmeningitis. Hier wie dort eine unkompensierte (höchstwahrscheinlich durch den lokalen entzündlichen Prozeß hervorgerufene und auf den Liquor beschränkte) Azidose, bei der also die CO_2-Spannung nicht entsprechend der Verdrängung der gebundenen Kohlensäure abgenommen hat, so daß es zu einer bedeutenden Verschiebung der aktuellen Reaktion nach der sauren Seite gekommen ist.

Die Werte für die CO_2-Spannung sind nach der bekannten Formel von *Hasselbach* ausgerechnet und liegen entsprechend dem alkalischeren p_H natürlich bedeutend niedriger als die für das Blutplasma bekannten. Wir hatten vorübergehend auch an eine andere Möglichkeit gedacht, als uns nämlich die englischen Arbeiten bekannt wurden, welche behaupten, daß in kohlensäurehaltigen Flüssigkeiten, wie den Körpersäften, die mit der Gaskette erhaltenen p_H-Werte (wegen teilweiser Reduktion der Kohlensäure an der Platinelektrode zu Ameisensäure) durchschnittlich um 0,2 zu niedrig liegen gegenüber dem richtigen

[1]) Vgl. die diesbezügliche Formel im Praktikum von *Michaelis*.

kolorimetrischen Werte (vgl. *Evans*, *C. Lovatt*, Journ. of Physiol. 54, 1921, Ref. Phys. Ber. 8, 7). Dieser Behauptung, die in Deutschland unseres Wissens noch nicht nachgeprüft worden ist, sind zwar schon *Cullen* und *Hastings* auf Grund erneuter Untersuchung entgegengetreten (Journ. of biol. Chem. 52, 1922; Phys. Ber. 16, 3). Immerhin hielten wir es angesichts unserer, gegenüber den elektrometrisch ermittelten Standardwerten des Blutes ziemlich alkalischen p_H-Werten für notwendig, die Frage selber zu prüfen. Und zwar auf folgende Weise: Die Werte der *Hasselbach*schen Formel sind elektrometrisch festgelegt. Setzt man deshalb einen kolorimetrischen p_H-Wert ein und ist dieser wirklich gegenüber dem elektrometrischen um 0,2 zu alkalisch, so muß man falsche Resultate erhalten, z. B. wenn man die CO_2-Spannung berechnet, zu viel zu geringen Spannungen kommen. Dies läßt sich aber sofort feststellen, wenn man einmal die CO_2-Spannung festlegt und sie so hoch wählt, daß sie dem fraglichen elektrometrischen (um 0,2 niedrigeren) p_H-Werte entsprechen würde. Erhält man bei dieser Kohlensäurespannung wieder den alten (um 0,2 zu alkalischen) Wert, so ist damit die Diskrepanz zwischen Gasketten- und Indikatorenmessung bewiesen, und nur wegen dieser ergab die von dem kolorimetrischen p_H ausgehende Rechnung die (zu) niedrige CO_2-Spannung. Von diesem Gedankengange aus haben wir in drei Fällen Liquor, welcher unsere üblichen p_H-Werte ergeben hatte, hinterher in einer kleinen Apparatur nach *van Slyke* (vgl. *Pincussen*, Mikromethodik, 1. Aufl., S. 108) mit Atemluft gesättigt (etwa 40 mm Hg CO_2-Spannung) und in dieser Probe dann nochmals das p_H bestimmt: es war in allen drei Fällen um über 0,2 nach der sauren Seite verschoben! Dies spricht also gegen die *Evans*sche Theorie und bekräftigt gleichzeitig unsere p_H-Messungen überhaupt (Tabelle III gibt eine Übersicht über zwei von diesen Fällen).

Tabelle III.

	p_H		CO_2-Gehalt gemessen Vol.-Proz.	CO_2-Spannung mm Hg	
	gemessen	berechnet		gemessen mm	berechnet mm
1. a) Nativer Liquor unter Paraffin. liquid.	7,55 →	—	60	—	(23)
b) Nach Sättigung mit Atemluft	7,30	(7,33)	etwa 61 [1])	etwa 40 ←	—
2. a) Nativer Liquor unter Paraffin. liquid.	7,55 →	—	48	—	(20)
b) Nach Sättigung mit Atemluft	7,28	(7,25)	etwa 49 [1])	etwa 40 ←	—

[1]) Da bei unserer (in $^1/_{20}$ ccm eingeteilten) Bürette, der wir uns zur titrimetrischen CO_2-Bestimmung bedienten, 1 Tropfen annähernd 1 Vol.-Proz. CO_2 entsprach, konnten wir nicht auf Bruchteile titrieren.

III.

Es bleibt uns jetzt noch übrig, zu untersuchen, was die Zahlen unserer Tabelle II für die Ionisation des Calciums in der Spinalflüssigkeit bedeuten. Da es uns ja hauptsächlich auf das Säuglingsalter ankommt, so nehmen wir hier, indem wir uns an die Fälle 5, 6 und 7 halten, als Durchschnittswerte p_H 7,53 und 52 Vol.-Proz. Gesamt-CO_2. Bei diesem p_H entsprechen letztere etwa 49 Vol.-Proz. gebundener CO_2, d. h. HCO_3 ist etwa 0,022 normal. Wir bekommen also folgende Gleichung: $[Ca^{\cdot\cdot}] = \frac{3 \cdot 10^{-8}}{0{,}022} \cdot 350$. Das ergibt für $Ca^{\cdot\cdot}$: 0,00048 mol. bzw. 0,0019 g-Proz. Demgegenüber können wir im kindlichen Serum nach den *van Slyke*schen Durchschnittszahlen (vgl. *Pincussen*, l. c.), bei einem p_H von 7,35, 56 Vol.-Proz. Gesamt-CO_2 annehmen. Hiervon sind 52 Vol.-Proz. gebunden, die Bicarbonatkonzentration ist also 0,023 normal. Berechnen wir aus diesen Zahlen den Ionisationsgrad des Calciums im Serum, so erhalten wir die Gleichung: $[Ca^{\cdot\cdot}] = \frac{4{,}5 \cdot 10^{-8}}{0{,}023}$ 350. Das ergibt für $Ca^{\cdot\cdot}$: 0,00068 molar bzw. 0,0027 g-Proz. Die Durchschnittswerte des Kaliums betrugen im Serum 0,017 g-Proz., im Liquor 0,013 g-Proz. Würde dem niedrigeren Kaliumwerte im Liquor ein *entsprechend* geringerer Ca-Ionengehalt gegenüberstehen, so müßten wir im Liquor 0,0020 g-Proz. $Ca^{\cdot\cdot}$ erwarten. Gefunden haben wir 0,0019 g-Proz. Also eine sehr gute Übereinstimmung.

Zusammenfassung.

Im unter Paraffin aufgefangenen Liquor von Kindern im Alter von ¾ bis 10 Jahren lag p_H, mit m Nitrophenol als Indikator gemessen, bei 18° zwischen 7,50 und 7,55. (Denselben Wert erhält man bei 38°.)

Der Gesamt-CO_2-Gehalt des Liquors betrug bei Säuglingen 52 Vol.-Proz.

Die Durchschnittswerte für Kalium betrugen 13,1 mg-Proz., für Calcium 6,9 mg-Proz.

Es wird wahrscheinlich gemacht, daß das Verhältnis der Calciumionen zu den Kaliumionen dasselbe ist wie im kindlichen Blutserum (im Liquor beträgt der Wert für $Ca^{\cdot\cdot}$ 0,0019 g-Proz.).

Über die Bedeutung der Strahlenabsorption für das Zustandekommen der biologischen Röntgenreaktion[1].

Von

Eugen Petry.

(Aus dem Zentralröntgeninstitut[2] des Landeskrankenhauses Graz.)

(Eingegangen am 30. Juni 1923.)

Die von *Grotthus* und *Draper* entdeckte Beziehung zwischen selektiver Absorptionsfähigkeit einer lichtempfindlichen Substanz für Strahlen bestimmter Wellenlänge und der — identischen — Lage des Maximums der photochemischen Wirksamkeit für die betreffende Reaktion kann allenthalben durch Versuche mit spektral zerteiltem Tageslicht oder mit Tageslicht, das durch Vorschaltung von künstlichen Farbenfiltern bestimmter Spektralgebiete beraubt ist, zum Ausdruck gebracht werden: *Nur die zur Eigenfarbe der Substanz komplementären Strahlungsbereiche erweisen sich als wirksam, da auch nur sie zur Absorption gelangen.* Derartige Versuchsanordnungen haben sich auch wiederholt zur Eruierung des eigentlichen lichtempfindlichen Bestandteiles in Reaktionsgemischen benutzen lassen (*Goldberg* (1), *Winther* (2, 3).

Der gleiche Zweck kann häufig durch *Ersatz des Farbenfilters durch eine entsprechend dicke Schicht der lichtempfindlichen, gefärbten Substanz selbst* oder des Reaktionsgemisches erreicht werden.

Nach *Draper* (4) haben ähnliche Versuche *Marchand* (5) (Eisenchlorid und Oxalsäure), *Goldberg* (1) (Chromsäure und Chinin), *Luther* und *Weigert* (6) (Anthracen), *Tappeiner* (7) (Eosin) u. a. ausgeführt und mit dieser Versuchsanordnung Tageslicht bzw. Kohlenbogenlicht seiner photochemischen Wirksamkeit für die bezügliche Reaktion zu berauben vermocht.

Das Gelingen dieser Versuchsanordnung hat jedoch zur unbedingten Voraussetzung, eine hinreichende Größe der Lichtabsorption der betreffenden Substanz bzw. eine *entsprechende Relation zwischen Absorption und chemischer Wirksamkeit* der Strahlen. Ist die letztere

---

[1] Eine vorläufige Mitteilung der Ergebnisse findet sich in der Wiener klin. Wochenschr. 1923, Nr. 21.

[2] Zufolge Beschluß der Abbaukommission aufgelöst seit 1. März 1923.

unverhältnismäßig größer als die erstere, so läßt sich das *Grotthus-Draper*sche Gesetz durch diese Versuchsanordnung nicht zum Ausdruck bringen.

So erwiesen sich z. B., *Plotnikow* (8), für die photochemische Oxydation der JH in Versuchen mit (andersartigen) Farbstoffiltern nur die blauen Strahlen als erregend; gleichwohl gelang es nicht, durch Vorschaltung einer Schicht des Reaktionsgemisches oder der JH-Lösung die Wirksamkeit des Tageslichtes zu schwächen. In Übereinstimmung damit war das Reaktionsgemisch farblos, und nicht, wie es einer selektiven Absorption für Blau entsprechen würde, gelb gefärbt: *es entsprach hier eben einer minimalen, auch optisch gar nicht zum Ausdruck kommenden und in Vorschaltversuchen sich nicht geltend machenden Absorption eine bedeutende photochemische Wirksamkeit* (*Plotnikow*).

Von *Weigert* (9) (dort auch seine übrigen Originalarbeiten) wurde ein derartiges Mißverhältnis zwischen Absorption und Wirksamkeit als charakteristisch für eine bestimmte Klasse von Lichtreaktionen — die *katalytischen* — angesprochen [s. darüber auch *Sheppard* (10), S. 152].

Bei diesen erscheint nämlich die vom photochemischen System chemisch umgesetzte Lichtenergie nicht (wie bei andersartigen Lichtreaktionen) „stöchiometrisch" auf der rechten Seite der Gleichung (im *höheren* Energieinhalt der Reaktionsprodukte), sondern sie wird lediglich zur Anbildung eines Katalysators verbraucht, durch dessen katalytische Wirksamkeit die (energie*ärmeren*) Reaktionsprodukte aus den Ausgangsstoffen auf rein chemischem Wege (s. Nachwirkung!) entstehen. In den quantitativen Beziehungen zwischen der zur Herstellung der wirksamen Menge dieses Katalysators notwendigen *Absorption von Lichtenergie* und dem *stöchiometrischen Endeffekt des ganzen Vorgangs* (in *Plotnikows* Falle also der umgesetzten Menge JH) drückt sich das bekannte quantitative Umsetzungsverhältnis aller Katalysatoren zu ihren Substraten aus: dieses schiebt sich hier also gewissermaßen als vergrößernder Storchschnabel zwischen absorbierter Lichtmenge und chemischen Effekt ein. „Die Mengenänderungen in der beobachteten chemischen Reaktion können von einer ganz anderen Größenordnung sein wie die durch die primäre Lichtwirkung verursachten Mengenänderungen, so daß zu dieser Klasse von Vorgängen die ungeheuer lichtempfindlichen Prozesse ... gehören" (*Weigert*, l. c., S. 42).

Auf andere Möglichkeiten des Zusammenhanges zwischen primärer Lichtwirkung und stöchiometrischem Endeffekt des Gesamtvorganges, welche das gleiche Mißverhältnis zwischen der Größe der Absorption und des chemischen Effekts involvieren müssen, wie es bei den katalytischen Reaktionen vorkommt, hat jüngst *Nernst* (11) hingewiesen.

Die Verfolgung des Einflusses vorgeschalteter Filter auf den chemischen Effekt eines sonst wirksamen Strahlengemisches hat sich somit im Bereiche der aktinisch-photochemischen Erfahrungen als ein wertvolles experimentelles Hilfsmittel erwiesen, welches gewisse Aufschlüsse über die Art des untersuchten Lichtvorganges sowie über die Frage, welcher der Reaktionsteilnehmer eines Gemisches der eigentlich lichtempfindliche Bestandteil ist, zu gewähren vermag.

Selektive Einflüsse spielen nun auch bei der Absorption der *Röntgenstrahlen* eine quantitativ bedeutsame Rolle. Es liegt daher nahe, anzunehmen, daß dieser selektiven Absorption der Röntgenstrahlen eine ähnliche photochemische Bedeutung zukomme, wie sie für die aktinische Lichtchemie durch das *Grotthus-Draper*sche Gesetz festgelegt ist; demnach wäre es möglich, daß auch bei der biologischen Röntgenreaktion die selektive Absorption eines besonders lichtempfindlichen Gewebsbestandteiles eine Rolle spielt.

In diesem Zusammenhange erscheint es wichtig, daß das Gewebe neben den die Hauptmasse bildenden, Röntgenstrahlen nur wenig absorbierenden Grundstoffen, Elemente von wesentlich höherem Absorptionsvermögen (Fe, Mn, J) in sehr niedriger Konzentration enthält. Da nun insbesondere die beiden erstgenannten Elemente sich durch die bekannten Untersuchungen von *C. Neuberg* (12) als hervorragende chemisch wirksame Lichtenergieüberträger für sichtbare Lichtstrahlung erwiesen haben, so habe ich bereits vor Jahren (13) darauf hingewiesen, daß diesen Elementen bei der Röntgenschädigung des Gewebes die Rolle sensibilisierender Farbstoffe zufallen könnte.

Die Frage nach der Beteiligung der selektiven Absorption am Zustandekommen der Röntgenschädigung schien mir nun einer direkten experimentellen Prüfung zugänglich, wenn es gelang, die eben dargelegte, bei aktinisch-photochemischen Untersuchungen bewährte filteranalytische Methode in den Dienst der röntgenbiologischen Fragestellung zu stellen.

Freilich dürfen wir dabei hinsichtlich der Beweiskraft solcher Versuche — besonders bezüglich der Frage nach der Natur des photochemischen Vorganges — keine zu weitgehenden Erwartungen hegen: dazu fehlen uns vorerst alle Grundlagen der Beurteilung, denn wir wissen nicht, ob unsere von der aktinischen Photochemie übernommenen Vorstellungen ohne weiteres auf chemische Lichtwirkungen der Röntgenstrahlen übertragen werden dürfen. *Vor allem wissen wir* (mangels jedweden experimentellen photochemischen Materials) *nicht, ob das Grothus-Drapersche Gesetz auch für die Röntgenwirkungen strenge Gültigkeit besitzt.* Die weitgehenden Unterschiede in den Absorptionsverhältnissen beider Strahlungen (besonders hinsichtlich der Fluoreszenzerscheinungen) könnten sich dabei immerhin geltend machen. Gewisse experimentelle Ergebnisse stützen diese Annahme einigermaßen, so z. B. die von *Holthusen* (14) außer Zweifel gestellte Existenz einer *physikalischen Sensibilisierung*, ganz besonders aber der von diesem Autor erbrachte Nachweis, daß an deren Zustandekommen nur die *Elektronenemission* aus dem Zusatz beteiligt sei, daß also die von einem beliebigen zugesetzten schweratomigen Stoff (dessen Hochfrequenzspektrum auch in keinerlei Beziehung zur photochemisch wirksamen Wellenlänge zu stehen braucht) emittierte Elektronenstrahlung den photochemischen Effekt zu erhöhen imstande ist, und derartige Befunde lassen einen Zweifel an der strengen Gültigkeit des *Grothus-Draper*-Gesetzes für die Röntgenstrahlen berechtigt erscheinen.

Wir dürfen daher von unseren Versuchen von vornherein keine so zwingenden Entscheidungen, wie etwa bei analogen Versuchen mit

aktinischem Licht erwarten, sie können vielmehr *nur orientierenden Charakter* haben. Trotzdem schien sich mir ihre Inangriffnahme auch aus anderweitigen Gesichtspunkten zu lohnen. Denn der Nachweis einer derartigen schützenden Filterwirkung von Gewebsbestandteilen konnte bei weiterer Verfolgung (durch Fraktionierung und Isolierung des wirksamen Bestandteils) zur *Eruierung des lichtempfindlichen Gewebselements* führen.

Solche Möglichkeiten konnten auch eine gewisse praktische Bedeutung bekommen, insofern dadurch die *Sensibilisierungsfrage* eine Förderung erfahren konnte. Andererseits konnte dadurch auch die selektive Absorption der Röntgenstrahlen in den Dienst des *Röntgenschutzes* gestellt werden und ein Strahlenfilter gewonnen werden, welches nach Analogie des roten Dunkelkammerglases eine reinere Aussonderung der gewebsschädigenden Strahlen von den auf Platte und Schirm wirksamen ermöglichen würde als unsere bisher verwendeten Metallfilter (protrahierte Durchleuchtungen und wiederholte Aufnahmen!).

Eine *unmittelbare* Übertragung der Versuchsanordnung von *Draper*, *Tappeiner* usw. — die Vergleichung *un*filtrierten Lichtes mit einer Strahlung gleicher spektraler Zusammensetzung und Intensität, in deren Gang jedoch eine Lösung der empfindlichen Substanz eingeschaltet war — mußte in unserem Falle wegen der starken *kontinuierlichen* Absorption des Wassers für Röntgenstrahlen, infolge deren die Strahlen bereits durch die Passage einer gleichdicken Schicht destillierten Wassers eine erhebliche Schwächung erfahren mußten, ungeeignet erscheinen. Wenn wir also ermitteln wollten, ob die Strahlen im empfindlichen Gewebe *außer der* unvermeidlichen, *durch Streuung* und (kontinuierliche) *Absorption im destillierten Wasser verursachten überdies noch durch die selektive Absorption bestimmter, lichtempfindlicher Gewebsbestandteile* eine besondere Intensitätsverminderung erfahren, so konnte darüber nur ein *Vergleich der schirmenden Wirkung einer Schicht Gewebsbrei mit jener einer gleich dicken Wasserschicht* (bezüglich der Röntgenschädigung) Aufschluß geben.

Aus praktischen Gründen erschien es mir nicht möglich, als Filtersubstanz und als Testobjekt das nämliche Gewebe zu wählen, ich war daher darauf angewiesen, durch *Lymphdrüsenbrei* zu filtern und als Testobjekte *Keimlinge* zu verwenden. Da wohl kaum anzunehmen ist, daß für verschiedene Gewebe verschiedenartige chemische Elemente die Lichtempfindlichkeit vermitteln, so kann dem wohl kein Bedenken entgegenstehen.

Von ausschlaggebender Bedeutung konnten dabei wohl nur mit *harten* Strahlen angestellte Versuche sein. Denn einmal werden durch Verwendung weicherer Strahlengemische die durch unvermeidliche Unterschiede in der Schichtdicke bei der Filtermasse bedingten Fehler unverhältnismäßig vergrößert, andererseits durfte nicht übersehen werden, daß der Gewebsbrei durch seinen Salzgehalt (und vielleicht auch durch organische Bestandteile) ein etwas größeres Absorptionsvermögen besitzen muß als Wasser; falls nun der kontinuierlichen Absorption (entsprechend unseren Ausführungen) ein Einfluß auf den

chemischen Effekt zukommt, so konnte bereits durch derartige Unterschiede in der kontinuierlichen Absorption eine selektive Filterwirkung (im Sinne unserer Fragestellung) vorgetäuscht werden, ein Fehler, der gleichfalls (entsprechend dem raschen Ansteigen der Absorption mit der Wellenlänge) besonders bei weichen Strahlen zu fürchten war.

Die auf ihre Schirmwirkung zu vergleichenden Filtermassen (Lymphdrüsenbrei bzw. destilliertes Wasser) befanden sich bei meinen Versuchen in parallelepipedischen vollkommen metallfreien Kartonschachteln von genau gleichen Dimensionen (Höhe 2,7 cm, Basis 88 × 56 cm), welche durch Baden in heißem Paraffin undurchlässig gemacht waren. Nach vollkommener Füllung (mit sorgfältigem Ausschluß von Luftblasen) wurden sie nach oben zu durch einen dünnsten Film abgeschlossen. Jede dieser Schachteln ruhte (in genau horizontaler Lage) auf einem aus einem 2,1 cm hohen lackierten Bleistreifen gebildeten ovalen Ring, der von der von ihm getragenen Schachtel allseits überragt wurde. Diese Ringe lagen auf einer dicken Bleiglasplatte auf, so daß dadurch eine gegen von außen (seitlich und unten) eindringende Sekundärstrahlen geschützte Kammer zur Aufnahme der zu bestrahlenden Keimlinge geschaffen wurde, die nur von den primären Strahlen getroffen werden konnten, welche die zur Prüfung gelangende Filtermasse (Drüsenbrei, bzw. Wasser) passiert hatten. Die räumliche Anordnung war derart, daß beide Kartonschachteln mit den Langseiten aneinandergelagert, nur durch einen Bleigummistreifen getrennt waren; die Keimlingsproben lagen in der Mitte der äußeren Hälfte des vom Bleiring umschriebenen Ovals (auf feuchtem Filtrierpapier, Rafe nach unten) vor ihnen lag je ein *Sabouraud*-Plättchen; die Röhre war mit dem Fokus über der Mitte der Trennungswand zwischen beiden Schachteln (erster Hauptschnitt in der Trennungswand verlaufend) ausgerichtet. Die Distanz zwischen Fokus und Keimlingen (bzw. Dosimeter) ist in jedem Versuche besonders bezeichnet.

Die verwendeten, frisch aus dem Schlachthause bezogenen Rinderlymphdrüsen waren mit Schere und Wiegmesser zerkleinert worden. Bereits bei der Auswahl der Tiere[1]) war auf sorgfältigen Ausschluß aller zu Kalkablagerungen in den Drüsen führender Erkrankungen geachtet worden, und die Durchsicht der Präparate bestätigte die volle Erreichung dieses Zwecks.

Von den verwendeten Samengattungen waren ausschließlich die in vielfachen Vorversuchen als mit konstantester Empfindlichkeit auf Bestrahlung reagierenden Sorten[2]) ausgewählt worden.

Die zur Verwendung kommenden Keimlinge waren im Dunkeln auf Filtrierpapier gezogen worden und Exemplare gleicher Wurzellänge eines Keimversuchs als Versuchsmaterial verwendet, von dem ein Teil unbestrahlt blieb, ein Teil unter Wasser, der Rest unterm Drüsenbrei bestrahlt wurde. Pflanzengattung, Keimzeit und Wurzellänge ist bei den einzelnen Versuchen angegeben.

Die Röhrenhärte (*Helm*-Wasserkühlröhre) wurde mit *Holzknecht*scher Distanzregulierung auf der in den Versuchsberichten angegebenen Härte

---

[1]) Wofür sowie für die Überlassung des Materials ich den Herren Oberveterinärräten *Haas* und *Poppmaier* sowie Herrn Dr. *Keller* besonderen Dank schulde.

[2]) Siehe diese Zeitschr. **119**, 29; **135**, 362.

gehalten. Hinsichtlich der übrigen Details der verwendeten pflanzenphysiologischen Technik sowie der röntgenologischen Apparatur siehe diese Zeitschr. **119**, 28.

Ich lasse nun die Versuchsbeschreibungen folgen.

Versuch 1. Weizenkeimlinge vom Ende des dritten Quellungstages und 7 bis 8 mm langer Wurzel. Fokaldistanz 18,5 cm. Bestrahlung bei größter technisch zulässiger Härte (8 W) 25′ bei 2,7 MA (etwa 70 MAM). Unter *beiden* Filtern gemessene Dosis: 13 H.

Länge der Exemplare nach 11 Tagen:

Unbestrahlte Probe: 159, 178, 160, 175, 174, 160, 183, 165, 168, 183, 165, 180, 165, 162, 176, 180, 162, 170, 194, 200, 178; Mittel: **178 mm.**

Hauptprobe (unterm Brei bestrahlt): 42, 52, 43, 44, 57, 52, 47, 38, 50, 45, 56, 49, 41, 43, 48, 45; **Mittel: 47 mm = 27 Proz.** (der Unbestrahlten).

Kontrollprobe (unterm Wasser bestrahlt): 31, 38, 65, 64, 42, 42, 43, 43, 41, 45, 38, 48, 47, 40, 36, **Mittel: 44 mm = 25 Proz.**

Dieser mit härtester Primärstrahlung angestellte Versuch *läßt einen Unterschied in der Schirmwirkung beider Filtermassen nicht erkennen.* Ich habe daher von einer Verwendung von durch technische Metallfilter noch weiter gehärteten Strahlen abgesehen, habe aber im Anschluß daran zwei Versuche mit weicheren Strahlengemischen angestellt, deren Beweiskraft wir (s. oben) allerdings geringer einschätzen müssen.

Versuch 2. Weizenkeimlinge (43 Stunden, 7 mm Wurzellänge), Fokaldistanz 17 cm. Bestrahlung bei etwa 6½ W. Dosis: 40 Minuten bei 3 bis 4 MA (etwa 140 MAM). *Sabouraud-Holzknecht:* unterm Brei 14 H, unterm Wasser 15 H.

Länge der Exemplare nach 17 Tagen: Unbestrahlt (Mittel von 7 Exemplaren): 313 mm. Hauptprobe (Mittel von 13 Exemplaren): 38 mm = **12 Proz.** Kontrollprobe (Mittel von 13 Exemplaren): 38 mm = **12 Proz.**

Versuch 3. Roggenkeimlinge von 40 Stunden und 13 bis 15 mm Wurzellänge. Fokaldistanz 17 cm. Bestrahlung bei 6½ W 14 Minuten bei 3 bis 4 MA (etwa 50 MAM). Unterm Brei 5,5 H, unterm Wasser 6 H.

Länge der Exemplare nach 9 Tagen: Unbestrahlt (Mittel von 14 Exemplaren): 182 mm. Hauptprobe (Mittel von 25 Exemplaren): 153 (**85 Proz.**). Kontrollprobe (Mittel von 25 Exemplaren) 129 mm (**70 Proz.**).

Die Einzelwerte beider Versuche zeigten untereinander die gleiche Übereinstimmung wie in Versuch 1.

Die Härte der Röhre war in allen drei Versuchen auf Grund der Relation zwischen angelegter Spannung (Kontaktknopf) und abgelesener Stromstärke nach dem *Ohm*schen Gesetz (Gleichrichter!) festgelegt worden. Die Eichung der so erhaltenen Werte mit Hilfe des *Walter*schen Härtemessers erfolgte gelegentlich (unabhängig von den Versuchen).

Die Berechnung der in den drei Versuchen *verabfolgten* Dosen (aus den Milliamperеminuten und der Fokaldistanz) und der Vergleich dieser Werte mit den in den einzelnen Versuchen *unterm Filter* (nach *Sabouraud-Holzknecht*-Einheiten) *gemessenen* Dosen (= verabfolgte Dosis — absorbierte Strahlung) zeigt deutlich den Unterschied in der Penetrationskraft der bei Versuch 1 verwandten Strahlung gegenüber den beiden nachfolgenden Versuchen.

Der erste der beiden mit weichen Strahlen angestellte Versuch (2) hatte also das gleiche Ergebnis wie der mit härtester Primärstrahlung angestellte Versuch 1. Nur bei Versuch 3 zeigt sich die Kontrollprobe stärker geschädigt als die Hauptprobe. Eine wesentliche Bedeutung können wir aber diesen geringfügigen Differenzen mit Rücksicht auf die geringe Höhe der verabfolgten Dosis nicht zuerkennen. Denn, wie meine Erfahrungen (in Bestätigung früherer, eingehender von *Holthusen* an Wurmeiern angestellter Untersuchungen) gezeigt haben, sind die individuellen Sensibilitätsdifferenzen besonders bei so niedrigen Dosen stark hervortretend. Berücksichtigen wir überdies die oben dargelegten, bei der Verwendung weicher Strahlen mit in Betracht kommenden Momente, so können wir also auch in diesem Versuche keine Analogie zu den Versuchsergebnissen von *Draper*, *Goldmann*, *Tappeiner* usw. erblicken, und wir müssen vielmehr als Ergebnis unserer Versuche bezeichnen, *daß dem empfindlichen Gewebe keine wesentlich stärkere Schirmwirkung hinsichtlich der biologischen Strahlenwirkung als dem destillierten Wasser zukommt, welche eine (gewissermaßen stöchiometrische) Beteiligung der selektiven Strahlenabsorption an der Reaktion beweisen würde, daß vielmehr auch hier einer geringen Absorption eine bedeutende Wirkung entspricht*, wie es bei den katalytischen Reaktionen des aktinischen Lichtes der Fall ist.

Nun besitzen wir leider hinsichtlich der uns bekannten photochemischen Reaktionen wohldefinierter Substanzen (Ederlösung, Jodoform) im Röntgenlichte so gut wie gar kein experimentelles Material, welches uns über die Reaktionskinetik dieser Vorgänge, sowie über den Einfluß der spektralen Zusammensetzung der Strahlen und über die quantitativen Beziehungen zwischen Absorption und stöchiometrischem Effekt hinreichend orientieren würde, um von „katalytischen Röntgenreaktionen“ sprechen zu können. Dennoch spricht schon der durch die Formelgleichung charakterisierte Ablauf beider Reaktionen aus energetischen Gründen für ihre Zugehörigkeit zu den katalytischen Lichtreaktionen. Andererseits kann uns — aus ähnlichen Erwägungen — gerade bei der an Sauerstoffanwesenheit gebundenen biologischen Röntgenreaktion (welche also vermutlich ebenfalls „arbeitsleistend“ verläuft) eine Zugehörigkeit zu den katalytischen Lichtreaktionen nicht befremden. Nach alledem wird uns *vorläufig* eine derartige Annahme als die nächstliegendste Erklärung unserer Befunde erscheinen.

Keinesfalls besteht jedoch eine Veranlassung, aus meinen Befunden zu schließen, daß — in Bestätigung von Vermutungen *Maraglianos* (15) — auch die *nicht zur Absorption gelangenden Anteile* der Strahlung einen biologischen Effekt ausüben könnten. Alle derartigen aus der Betrachtung der hohen biologischen Wirksamkeit der so wenig

zur Absorption gelangenden harten Strahlen geschöpften Vorstellungen erübrigen sich vollkommen bei gebührender Berücksichtigung der bei den katalytischen Lichtreaktionen vorwaltenden quantitativen Beziehungen zwischen Absorption und chemischem Effekt, durch welche wir erkennen, daß der minimale Anteil der einfallenden Strahlen, welcher zur Absorption gelangt, unter Mitwirkung der seinen chemischen Ertrag ins ungemessene steigernden, von *Weigert*, *Nernst* u. a. dargelegten Mechanismen gleichwohl ausreicht, die resultierenden chemischen Umsetzungen zu erklären. Aber auch wenn wir von diesen Zusammenhängen keine Kenntnis besitzen würden, müßte es uns schon im Hinblick auf den ersten Hauptsatz der Thermodynamik weitaus näherliegend erscheinen, daß die chemisch-biologischen Effekte auf Rechnung des — wenn auch noch so geringfügigen — *absorbierten* Anteils der einfallenden Strahlung zu setzen seien, als auf Rechnung des das Objekt unverändert durchsetzenden Teiles.

Im Anschluß an diese Versuche habe ich auch die andere, von den aktinischen Photochemikern verwandte Versuchsanordnung herangezogen, und den Einfluß von aus Eisen-, Kalisalzen und Phosphaten bestehenden Filtern (Imprägnation von Filtrierpapier bzw. Verwendung von photographischem Blaupapier), deren Dicke so gewählt war, daß darunterliegende Holzknechttabletten eine eben merkliche Schwächung gegenüber der frei (offen) bestrahlten Kontrollseite anzeigten, auf die Empfindlichkeit geprüft, konnte aber auch bei dieser Versuchsanordnung keine nennenswerte Schwächung der biologischen Wirksamkeit der Strahlen gegen Weizen durch die verwandten Filter nachweisen.

Literatur.

1) *Goldberg*, Zeitschr. f. physik. Chem. **41**, 1. — 2) bis 3) *Winther*, Zeitschr. f. wiss. Photogr. **7**, 409; **8**, 208; **9**, 205, 229. — 4) *Draper*, s. *Eder*, Photochemie, S. 43, Halle 1906. — 5) *Marchand*, ebendaselbst. — 6) *Luther* und *Weigert*, Zeitschr. f. physik. Chem. **53**, 385. — 7) *Tappeiner*, Deutsch. Arch. f. klin. Med. **80**, 1904. — 8) *Plotnikow*, Zeitschr. f. physik. Chem. **58**, 226. — 9) *Weigert*, Sammlung chem.-techn. Vorträge (*Herz*) *XVII*, H. 6 bis 8. — 10) *Sheppard*, Lehrb. d. Photochem. Deutsch von *Ikle*, S. 152, Leipzig 1916. — 11) *Bodenstein*, Ergebn. d. exakt. Naturwiss. I, 1922 S. 221 f. Berlin, Springer. — 12) *Neuberg*, diese Zeitschr. **13**, 305; **17**, 270; **27**, 210; **29**, 279. — 13) *Petry*, ebendaselbst **56**, 341. — 14) *Holthusen*, Albert Schönbergs Fortschr. a. d. Gebiete der Röntgenstrahlen **29**, 777. — 15) *Maragliano*, Strahlentherapie **6**, 340; s. auch *Küpferle* und *Lilienfeld*, ebendaselbst **9**, 10.

Zur Frage des Ionenaustausches im Blut.

Von

Klothilde Gollwitzer-Meier.

(Aus der medizinischen Klinik der Universität Greifswald.)

(Eingegangen am 30. Juni 1923.)

Die Serumzusammensetzung erfährt bei Änderung der Kohlensäurespannung des Gesamtblutes bedeutende Umbildungen[1]). Dies hängt im wesentlichen mit Erscheinungen zusammen, die sich an der Grenzfläche von Blutkörperchen und Serum abspielen. Zunahme der Kohlensäurespannung und damit der Wasserstoffionenkonzentration vermindert das Potential der Grenzfläche. In den an den beiden Belegungen der Doppelschicht festgehaltenen Ionen tritt ein Wechsel auf, der zu einem Ionenaustausch zwischen Blutkörperchen und Serum bzw. ihren Oberflächen führt. Bei dem Ionenaustausch wird zwischen Körperchen und Serum gewöhnlich ein reiner Anionenaustausch angenommen, der in äquivalenten Verhältnissen vor sich geht. Können aber tatsächlich alle Veränderungen der Serumzusammensetzung bei einem Wechsel der Reaktion durch einen solchen reinen Anionenaustausch erklärt werden? Bei diesen Untersuchungen muß man sich daran erinnern, daß das Potential der Grenzfläche auch den Quellungszustand der Körperchenkolloide beeinflußt. Die Quellung nimmt zu mit Zunahme der Wasserstoffionenkonzentration im Blute und ist außerdem in verschiedener Weise von den übrigen Ionen des Suspensionsmediums abhängig. Das Quellungswasser wird dem Serum entzogen, das dadurch eine Eindickung erfährt. Änderungen der Serumzusammensetzung gleichzeitig mit einer solchen der Kohlensäurespannung sind also nur zum Teil durch den Ionenaustausch, zum Teil durch eine Wasserverschiebung zu erklären.

In den früheren Versuchen war die Änderung der Serumzusammensetzung bei verschiedenen Kohlensäurespannungen verfolgt, die Eindickung aber in den Berechnungen nicht genügend berücksichtigt worden. Es ist dazu notwendig, die Volumschwankungen des Serums

---

[1]) *Kl. Meier*, Zeitschr. f. d. ges. exper. Med. **29**, 322, 1922.

oder der Blutkörperchen zu kennen. Als einfachste Methode erweist sich hierfür die Volumbestimmung der Blutkörperchen mittels Hämatokriten. Inzwischen vorgenommene Untersuchungen über die Quellbarkeit der Blutkörperchen ergaben eine Zunahme des Blutkörperchenvolumens des vorher mit atmosphärischer Luft geschüttelten Blutes bei Erhöhung der Kohlensäurespannung auf etwa 90 mm um durchschnittlich 8 Proz. des Ausgangswertes. Mit Hilfe dieser Werte kann die Eindickung und die auf Kosten dieser Eindickung zu setzende Änderung der Serumzusammensetzung berechnet werden.

Tabelle I enthält einen Versuch ganz analog früheren Versuchen, nur mit dem Unterschied, daß gleichzeitig mit den Bicarbonat- und Cl-Bestimmungen Volummessungen vorgenommen wurden. Die Berechnung der molaren Zunahme an $NaHCO_3$ in dem unter Paraffinöl von den Körperchen abgetrennten Serum und der molaren Cl-Abnahme bei steigenden Kohlensäurespannungen ergibt eine bedeutende Differenz zugunsten des $NaHCO_3$. Zieht man die Eindickung mit in Rechnung, so vermindern sich die Werte für die $NaHCO_3$-Zunahme und erhöhen sich die für die Cl-Abnahme. Die Differenz zwischen beiden wird geringer. Trotzdem reicht auch nach dieser Berechnung das durch die Cl-Abwanderung an das Blutkörperchen freigewordene Alkali für die Mehrbindung an Kohlensäure im Serum nicht aus. Früher war von mir die Annahme gemacht worden, daß von den Blutkörperchen an das Serum abgegebene Kationen für einen Teil dieser Kohlensäurebindung im Serum in Betracht kommen, daß also neben dem Anionenaustausch zwischen Blutkörperchen und Serum bei Änderung der Kohlensäurespannung auch ein Kationenaustausch auftritt. Doch ist auch die Möglichkeit zu erörtern, ob außer den Cl-Ionen noch andere Anionen aus dem Serum verschwinden und ihr Kation dadurch zur Kohlensäurebindung verfügbar machen, wie dies *Doisy*, *Eaton* und *Chouke*[1]) annehmen. Wenn es nun auch wahrscheinlich ist, daß außer den Cl-Ionen noch andere Anionen an die Blutkörperchen gehen, so ist doch die nicht durch Cl-Abwanderung freigewordene und kohlensäurebindende Alkalimenge im Serum zu groß, als daß sie nur durch die Abwanderung anderer Anionen an das Blutkörperchen zu erklären wäre. Die aus den Cl-Verbindungen für die Kohlensäurebindung freigemachte Alkalimenge bindet nach diesen Versuchen nur etwa zwei Drittel der wirklich gebundenen Kohlensäure und nach den vor kurzem mitgeteilten Versuchen von *Mellanby* und *Wood*[2]) noch weniger. Dieselben Autoren wiesen auch nach, daß die Alkalimenge im Serum tatsächlich zunimmt, wenn ein kohlensäurefreies Blut auf den Kohlensäuregehalt des Normalblutes gebracht wird. Sie ziehen daraus den Schluß, daß bei Erhöhung der Kohlensäurespannung des Gesamtblutes innerhalb des genannten Spannungsbereiches Na aus den Blutkörperchen in das Serum übertreten muß.

Die Verhältnisse sind einfacher zu übersehen, wenn die Blutkörperchen statt in Serum in einer physiologischen NaCl-Lösung gewaschen und suspendiert werden. Vor Kohlensäurezuleitung wurde die Waschflüssigkeit untersucht und auch das Blutkörperchenvolumen bestimmt. Die NaCl-Lösung enthielt keine gebundene Kohlensäure. Mit Zunahme der Kohlen-

[1]) *E. Doisy*, *E. Eaton* und *K. Chouke*, Journ. of biol. Chem. **53**, 61, 1922.
[2]) *J. Mellanby* und *C. Wood*, Journ. of Physiol. **57**, 113, 1923.

Tabelle I. Blutkörperchen im Eigenserum.

1	2	3	4	5	6	7	8	9
						Eindickung berechnet		
CO_2-Spannung im Gesamtblut	CO_2-Vol.-Proz. im Serum	NaCl mg-Proz. i.n Serum	Hämatokrit-werte für 0,1 ccm Blut	Zunahme der mol. $NaHCO_3$-Konzentration	Abnahme der molaren Cl-Konzentration	Zunahme der mol. $NaHCO_3$-Konzentration	Abnahme der molaren Cl-Konzentration	Differenz zwischen 7 u. 8
Blut m. Luft geschütt.	29,0	565	40,0	—	—	—	—	—
45,7	60,2	532	41,8	0,0139	0,0056	0,0131	0,0083	0,0048
63,2	73,5	514	42,3	0,0189	0,0087	0,0181	0,0121	0,0060
90,0	77,3	508	42,8	0,0215	0,0197	0,0200	0,0136	0,0064

Tabelle II. Blutkörperchen in 0,9proz. NaCl-Lösung gewaschen und suspendiert.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
							Eindickung berechnet		
Nr.	CO_2-Spannung in d. Suspension	CO_2-Vol.-Proz. i. d. abgetrennten NaCl.-Lösung	NaCl mg-Proz. i. d. abgetrennten NaCl-Lösung	Hämatokrit-werte für 0,1 ccm	Zunahme der mol. $NaHCO_3$-Konzentration	Abnahme der molaren Cl-Konzentration	Zunahme der mol. $NaHCO_3$-Konzentration	Abnahme der molaren Cl-Konzentration	Differenz zwischen 7 u. 8
1	θ	θ	844	42,3	—	—	—	—	—
	19,4	25,0	820	44,2	0,0111	0,0041	0,0107	0,0087	0,0020
	45,2	44,3	805	46,0	0,0197	0,0066	0,0185	0,0136	0,0049
	95,9	54,6	796	46,2	0,0243	0,0086	0,0226	0,0172	0,0054
2	θ	θ	813	37,5	—	—	—	—	—
	36,9	35,0	772	39,8	0,0156	0,0070	0,0150	0,0119	0,0031
	47,6	40,5	765	40,4	0,0192	0,0082	0,0183	0,0148	0,0035
	117,8	58,8	753	40,5	0,0268	0,0102	0,0256	0,0165	0,0091
3	θ	θ	877	26,8	—	—	—	—	—
	25,4	19,4	848	27,5	0,0086	0,0049	0,0086	0,0063	0,0023
	47,0	25,9	838	28,0	0,0115	0,0089	0,0113	0,0090	0,0023
	86,9	32,4	829	28,7	0,0144	0,0098	0,0141	0,0118	0,0023
4	θ	θ	877	39,8	—	—	—	—	—
	26,7	33,9	844	42,0	0,0151	0,0056	0,0146	0,0109	0,0037
	81,1	52,6	807	42,8	0,0234	0,0119	0,0222	0,0188	0,0034

säurespannung in der Suspension stieg die Menge der gebundenen Kohlensäure in der unter Paraffinöl abgetrennten und dann mit Luft geschüttelten Waschflüssigkeit, während die Cl-Menge abnahm. Berechnung der Differenz der molaren Konzentrationen ergab, wie beim Serum, daß die Zunahme der $NaHCO_3$-Konzentration in der Waschflüssigkeit größer war als der Abnahme der Cl-Menge entsprach. Diese Unterschiede bleiben auch bei Berechnung der Eindickung bestehen (Tabelle II).

Bei der NaCl-Blutkörperchensuspension enthält die Außenflüssigkeit an Anionen nur Cl-Ionen. Einleitung von Kohlensäure in die Suspension ruft einen Anionenaustausch hervor, bei dem Cl an die Blutkörperchen, HCO_3 an das Na der Suspensionsflüssigkeit geht. Bestimmt worden war die Cl-Ionenkonzentration und die Menge der gebundenen Kohlensäure. Der letzteren entspricht eine äquivalente Kationenkonzentration. Da nun mehr HCO_3-Ionen in der Lösung aufgenommen und in ihr gebunden werden als vorher Cl-Ionen, so kann der Ionenaustausch bei Änderung des Grenzflächenpotentials nicht in äquivalenten Verhältnissen vor sich gehen. Es muß außerdem auch ein Kationenaustausch stattfinden, wie dies bereits auf Grund der Serumuntersuchungen angenommen worden war.

Zusammenfassung.

Die durch Änderung der Blutreaktion hervorgerufene Umbildung in der Serumzusammensetzung wird zum Teil durch einen Ionenaustausch zwischen Blutkörperchen und Serum, zum Teil durch Wasserverschiebungen erklärt. Untersuchungen am Serum ergeben, daß auch bei Berücksichtigung der Eindickung ein Anionenaustausch allein die Verhältnisse im Serum nicht genügend erklärt.

Untersuchungen an mit 0,9proz. NaCl-Lösung gewaschenen Blutkörperchen ergaben, daß bei Kohlensäurezuleitung zur Suspension die Cl-Konzentration der unter Paraffinöl abgetrennten NaCl-Lösung abnimmt und ihre Kohlensäurebindungsfähigkeit zunimmt. Die Zunahme der Kohlensäurebindungsfähigkeit der Waschflüssigkeit ist bei Berücksichtigung der Volumveränderungen größer, als es nach der Verminderung des Cl-Gehaltes zu erwarten wäre. Es muß deshalb angenommen werden, daß auch ein Kationenaustausch zwischen Blutkörperchen und Suspensionsflüssigkeit stattfindet.

Über Herabsetzung des Blutzuckers beim normalen Kaninchen durch Ergotamin.

Von

E. J. Lesser und K. Zipf.

(Aus dem Laboratorium der städtischen Krankenanstalten in Mannheim.)

(Eingegangen am 30. Juni 1923.)

Mit 3 Abbildungen im Text.

Von *Miculicich*[1]) ist gezeigt worden, daß Ergotoxin die Adrenalinglykosurie beim Kaninchen aufhebt, die Adrenalinhyperglykämie beim Kaninchen stark herabsetzt. *Fröhlich* und *Pollack*[2]) haben dann gefunden, daß Ergotoxin phosphor. in 0,005proz. Lösung die zuckertreibende Wirkung des Adrenalins an der herausgeschnittenen Froschleber aufhebt. Neuerdings hat *J. H. Burn*[3]) angegeben, daß eine schwache Insulingabe, die keine Krämpfe hervorruft, durch vorherige Ergotamininjektion (5 mg 2 Stunden vor der Insulingabe) stark wirksam wird und hypoglykämische Krämpfe hervorruft. Wir haben an der Froschleber gefunden, daß Ergotamin in 0,005proz. Lösung die Wirkung des Adrenalins stark abschwächt, aber nicht aufhebt. Ein solcher Versuch ist in Abb. 1 dargestellt. Diese enthält einen Normalversuch vom 20. Februar 1923, bei dem 4 Stunden lang 0,7proz. Kochsalzlösung durch die Froschleber geleitet wurde (dünn gezeichnete Linie). Außerdem einen Versuch, bei dem in der dritten und vierten Stunde Adrenalin 1 : 500000 durch die Leber geschickt wird (unterbrochene Linie). Und endlich

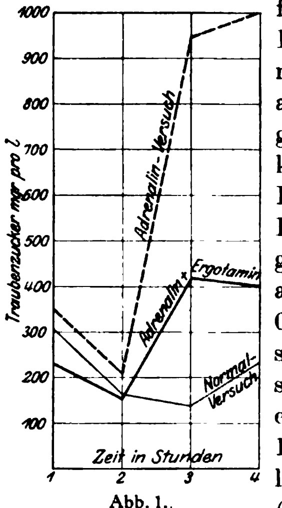


Abb. 1..

---

[1]) *Miculicich*, Schmiedebergs Arch. **69**, 133, 1912.

[2]) *Fröhlich* und *Pollack*, ebendaselbst **77**, 283, 1914.

[3]) *J. H. Burn*, Journ. of physiology **57**, 325, 1923.

einen Versuch, bei dem in der dritten und vierten Stunde eine Adrenalinlösung 1 : 500000 durch die Leber lief, welche außerdem 0,005 Proz. Ergotamin enthielt (stark ausgezogene Linie). Der Adrenalinversuch ist am 6. März, der Adrenalin-Ergotaminversuch am 5. März mit Tieren genau gleicher Vorbehandlung angestellt.

Tabelle I.

Blutzucker in mg in 100 g Blut										Bemerkungen
Vorher	30′	1h	1h 30′	2h	3h	4h	5h	6h	7h	
108	95	91	98	—	124	121	—	123	—	Hungerkaninchen 1400 g, 4 mg Ergotamin subkutan
82,5	83	68	85	84	79	—	100	—	98	Hungerkaninchen 1300 g, 7 mg Ergotamin subkutan
89	82	89	84	90	90	—	—	—	—	Kaninchen 1540 g, 4 mg Ergotamin subkutan
89	—	81,5	74	79	—	83	80	—	—	1500 g Kaninchen, 9 mg äthansulfosaures Ergotamin
100	84	89	104	102	99	—	—	—	95	1200 g Kaninchen, 10 mg äthansulfosaures Ergotamin
101	98	89	—	85	—	92	—	92	—	1300 g Hungerkaninchen, 25 mg äthansulfosaures Ergotamin subkutan

Nach *Dale* wirkt das Ergotamin lähmend auf die „fördernden Elemente“ des sympathischen Nervensystems. Es lag daher nahe zu untersuchen, ob es einen Einfluß auf den Blutzucker des normalen Kaninchens hat. In diesem Falle wäre festgestellt, daß es eine dauernde sympathische Erregung, einen sogenannten Zuckertonus in der Leber gäbe. Eine Reihe solcher Versuche ist in der Tabelle I wiedergegeben. Die Blutzuckerbestimmung geschah nach *Bangs* Mikromethode. Stets wurden mindestens drei Analysen gemacht und daraus das Mittel gezogen. Im Durchschnitt zahlreicher Analysen beträgt der wahrscheinliche Fehler dabei ± 3,5 Proz., die durch Ergotamin erhaltenen Abnahmen des Blutzuckers sind mit Ausnahme eines Versuches erheblich größer. Das Maximum der Abnahme beträgt 17,6 Proz., das Minimum 7,7 Proz. Im Durchschnitt aus sechs Versuchen beträgt die Abnahme 14,1 Proz. des Anfangswertes. Sie tritt regelmäßig in allen Versuchen auf, und zwar sowohl beim Kaninchen, das seit 18 Stunden keine Nahrung mehr erhielt, als auch beim Kaninchen, das bis zum Beginn des Versuches fressen konnte. Während der Zuckerbestimmungen erhielt das Tier keine Nahrung. Die Wirkung auf den Blutzucker ist eine kurzdauernde, nach 2 Stunden ist sie fast immer vorüber. In den späteren Stunden kann Erhöhung, Gleichbleiben oder geringes Absinken des anfänglichen Blutzuckergehaltes eintreten. In allen Fällen wurde das Ergotamin subkutan gegeben.

Die ersten drei Versuche sind mit dem weinsauren Ergotamin (Gynergen) gemacht. 1 ccm unserer Lösung enthielt 1 mg. Es mußten also immerhin nicht unerhebliche Flüssigkeitsmengen (bis zu 7 ccm)

injiziert werden. Die späteren Versuche wurden daher mit äthansulfosaurem Ergotamin gemacht, das sehr leicht löslich ist. Stets wurde eine bestimmte Menge abgewogen und nach Lösung in Wasser 1 bis 1,5 ccm subkutan gegeben. Das äthansulfosaure Ergotamin ist, wie uns Herr Prof. *Stoll* mitteilte, auch in Substanz nicht längere Zeit haltbar. Es ist möglich, daß das beim letzten Versuche benutzte Präparat bereits zum Teil zersetzt war. Darin liegt vielleicht die Ursache, daß auch diese hohe Dose nicht stärker gewirkt hat als um die Hälfte geringere, sowie dafür, daß auch bei dieser toxischen Gabe keinerlei Vergiftungserscheinungen auftraten[1]).

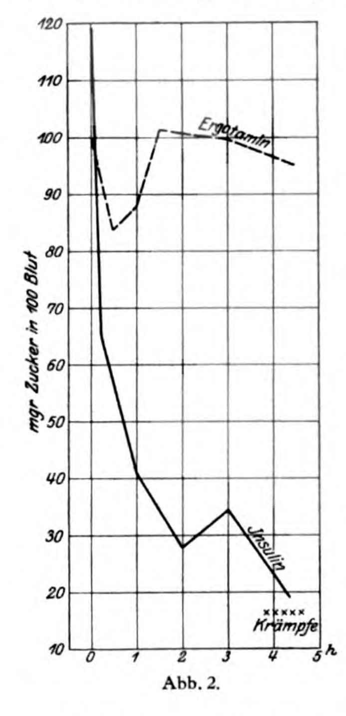


Abb. 2.

In Abb. 2 sind zwei Versuche, die zu verschiedenen Zeiten an demselben Tiere bei gleichem Ernährungszustande gemacht wurden, wiedergegeben. Die obere gestrichelte Kurve ist eine Ergotaminkurve, die untere eine Insulinkurve. Man sieht die große Differenz zwischen beiden. Dagegen können schwächere Insulindosen gelegentlich ähnliche Kurven ergeben wie unsere Ergotaminkurven.

Beim menschlichen Diabetiker haben wir in einem Falle durch tägliche Injektion von 0,5 mg Ergotamin eine deutliche Blutzuckersenkung erhalten können (von 220 auf 150 mg pro 100 ccm Blut, Ana-

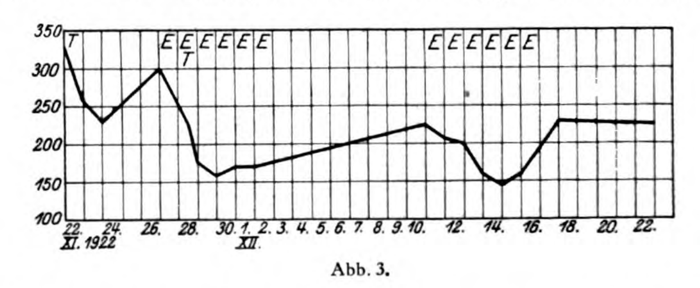


Abb. 3.

lysenmethode: Mikro-*Michaelis*). Nach Aussetzen der Injektion ging der Blutzucker wieder auf die alte Höhe. Der Versuch ist in Abb. 3

---

[1]) *Anmerkung bei der Korrektur:* Nach brieflicher Mitteilung von Herrn Prof. *A. Stoll* ist eine *subkutane* Gabe von 25 mg äthansulfosaurem Ergotamin für ein Kaninchen von 1200 g nicht toxisch.

dargestellt. In sämtlichen anderen untersuchten Fällen von Diabetes war keinerlei Beeinflussung des Blutzuckers durch Ergotamin zu erhalten (bei Gaben bis zu 2 mg pro die).

Herrn Prof. *A. Stoll* in Basel, sowie der chemischen Fabrik vormals Sandoz daselbst danken wir bestens für ihre Unterstützung bei der Ausführung dieser Versuche, sowie für die Überlassung der verwendeten Präparate.

Zusammenfassung.

1 bis 2 Stunden nach Injektion von 5 bis 10 mg Ergotamin pro Kilogramm Tier entsteht beim normalen Kaninchen eine Senkung des Blutzuckers um 14 Proz. des Normalwertes. Dies spricht dafür, daß die Zuckerbildung in der Kaninchenleber unter einem dauernden sympathischen Reize steht (sogenannter Zuckertonus).

Autorenverzeichnis.

Biochemische Zeitschrift

herausgegeben von

C. Neuberg-Berlin

Hunderteinundvierzigster Band



Berlin
Verlag von Julius Springer
1923

Druck von Friedr. Vieweg & Sohn Akt.-Ges., Braunschweig.

Inhaltsverzeichnis.

Die Rolle der Nebennieren bei Mangel an Vitamin B.

Von

A. v. Beznák.

(Aus dem Institut für allgemeine Pathologie der Universität in Debreczen.)

(Eingegangen am 29. Juni 1923.)

Die Frage, wie die Vitamine auf den Körper wirken, hat schon wiederholt zu dem Gedanken geführt, daß diese Wirkung in einem Zusammenhang mit den Drüsen der inneren Sekretion stehen könnte[1]).

Eine experimentelle Stütze erhielt diese Annahme durch den Befund von *Mc Carrison*[2]), der zeigte, daß, während bei dem experimentellen Vogelberiberi (Mangel an Vitamin B) alle Organe mehr oder weniger an Gewicht verlieren, die Nebennieren stark hypertrophieren. Gleichzeitig nähme ihr Adrenalingehalt zu.

Der erstere Befund wurde wiederholt bestätigt. *Findlay*[3]) fand bei Hühnern und Tauben eine Hypertrophie der Nebennieren um 159 Proz., während bei akut verhungerten Tauben auch eine Zunahme um 134 Proz. vorhanden war. Die Markzellen waren unverändert, die Rindenzellen zeigten eine Vermehrung des Lipoidgehaltes. Auch *Kellaway*[4]) bestätigt die Hypertrophie der Nebennieren und die Zunahme des Adrenalingehaltes. Hefe verhindert sowohl das Auftreten der polyneuritischen Erscheinungen, als auch der Hypertrophie. Er findet, daß die Hypertrophie besonders die Rinde betrifft. Umgekehrt gibt jedoch *Berg*[5]) an, daß die Rinde atrophiere, während das Mark hypertrophiere. Die Hypertrophie wurde bei Ratten bei Mangel an Vitamin B von *Emmett* und *Allen*[6]) beobachtet. *Mc Carrison* selbst brachte die Mehrproduktion von Adrenalin in Zusammenhang mit dem Entstehen von Ödemen bei Beriberi, zog aber dann diese Theorie wieder zurück[7]).

---

[1]) Siehe z. B. *Verzár* und *Bögel*, diese Zeitschr. **108**, 187, 1920.

[2]) *Mc Carrison*, Proc. Roy. Soc. B. **91**, 103, 1920; ref. Ber. ges. Physiol. **4**, 63; ferner: Ind. Journ. of med. Res. 1919, 7; ref. bei *Driel*, Néerl. tijdschr. f. Geneesk. **64**, 1350.

[3]) *M. Findlay*, Journ. of Path. and Bact. **24**, 175, 1921, nach Ber. ges. Physiol. **8**, 413.

[4]) *Kellaway*, Proc. Roy. Soc. **92**, 6, 1921; nach Ber. ges. Phys. **7**, 446.

[5]) *R. Berg*, Die Vitamine 1922, S. 104.

[6]) *Emmett* und *Allen*, Journ. of biol. Chem. 1920, S. 41; nach Physiol. Abstracts **5**, 240.

[7]) Ber. ges. Physiol. **4**, 65; nach Brit. med. Journ. **147**, 1920.

Kompliziert wurde jedoch diese ganze Frage durch den Befund von *Rondoni*[1]), der auch beim experimentellen Skorbut (oder Pellagra) der Meerschweinchen durch einseitige Fütterung mit Mais eine Hypertrophie der Nebennieren, daneben aber eine *Abnahme* des Adrenalingehaltes fand. Dabei mangelte jedoch nicht Vitamin B, sondern C. Das wurde dann auch von *Mc Carrison*[2]) sowie dem „Pellagra-Committee" bestätigt. Ersterer nahm nun an, daß Mangel an Vitamin B Hypertrophie mit Adrenalinmehrbildung, Mangel an C Hypertrophie mit Abnahme des Adrenalingehaltes bedinge.

Beim experimentellen Skorbut der Meerschweinchen sahen auch *La Mer* und *Campbell*[3]) eine Hypertrophie der Nebennieren. Ferner haben auch Befunde von *Peiser*[4]) eine Hypertrophie bei unzureichender, jedoch nicht direkt einseitiger Ernährung dieser Tiere erwiesen.

Widersprechend lauten dagegen wieder die Untersuchungen von *Svale Vincent* und *Hollenberg*[5]), die glauben, daß die Hypertrophie der Nebennieren überhaupt nur durch die Inanition bedingt werde und ebenso auch an verhungerten Tieren gefunden werde. Auch die Befunde beim Menschen lauten nicht übereinstimmend. *Ohno*[6]) beschreibt bei zwölf Beriberi-Leichen Markhypertrophie mit Zunahme des Adrenalingehaltes, während *Peiser*[7]) an 158 unterernährten Leichen eine Abnahme des Adrenalingehaltes auf ein Drittel gegenüber normal findet. Auch sollen die mit Adrenalindarstellung beschäftigten Fabriken bemerkt haben, daß der Adrenalingehalt der Nebennieren der unterernährten Tiere der Kriegszeit stark abgenommen hat.

Aus dieser Übersicht geht hervor, daß es erstens noch fraglich ist, ob die Hypertrophie der Nebennieren eine Folge des Vitaminmangels oder nur Folge der Inanition ist, und zweitens, wie sich der Adrenalingehalt verhält. Diese zwei Fragen haben wir im folgenden untersucht. Weitere Fragen, welche Rolle die verschiedenen Vitamine dabei spielen usw., bleiben für weitere Untersuchungen vorbehalten.

Die ganze Frage scheint uns von großem Interesse zu sein, denn es ist wohl kaum ein anderer Fall bekannt, in welchem die Nebenniere spezifisch hypertrophiert, und es sind außer den Degenerationen im Nervensystem sonst keine charakteristischen Veränderungen im avitaminös erkrankten Tierkörper bekannt geworden. Die Hypertrophie dieses Organs zur gleichen Zeit, wenn alle Organe atrophieren, verdient also weitgehendste Beachtung. Auf Anregung von Herrn Prof. *Verzár* wurden deshalb die folgenden Versuche ausgeführt.

---

[1]) *Rondoni*, Zeitschr. f. d. ges. exper. Med. **197**, 29; *Rondoni* und *Montagnani*, Sperimentale 1915.

[2]) *McCarrison*, Ind. Journ. of med. Res. 1919, S. 7.

[3]) *La Mer* und *Campbell*, Proc. Soc. exper. Med. **18**, 32, 1920; nach Physiol. Abstr. **6**, 398.

[4]) *Peiser*, Berl. klin. Wochenschr. **1**, 628, 1922; Med. Klinik **18**, 597, 1922; Zeitschr. f. d. ges. exper. Med. **27**, 234, 1922.

[5]) *Sv. Vincent* und *Hollenberg*, Endocrinology 1921; nach Physiol. Abstr.

[6]) *Ohno*, Mitt. d. med. Ges., Tokio 1917; nach *Driel*, l. c.

[7]) *Peiser*, l. c.

Methodik.

Die Untersuchungen teilen sich in zwei Gruppen. Erstens wurden Organgewichtsbestimmungen gemacht, um die Änderung des Gewichts der Nebennieren zu kontrollieren und in Parallele mit der Gewichtsänderung anderer Organe zu setzen. Zweitens wurden Adrenalinbestimmungen im Extrakt der Nebennieren gemacht.

Die Versuche sind an über 40 Tauben ausgeführt worden. Darunter befanden sich zehn normale Kontrolltiere und 19 Tiere mit schwerer Avitaminose.

Der allgemeine Versuchsplan war, daß zuerst untersucht werden sollte, wie sich die Nebenniere bei vollständigem Vitaminmangel verändert. Ein Vergleich dieser beiden Versuchsreihen mußte das klären. Da aber behauptet worden war, daß die Inanition allein die Ursache der Hypertrophie sei, so wurde untersucht, ob die Nebennieren auch dann hypertrophieren, wenn das Tier hungert, daneben aber Hefe als Vitamin B erhält. War der Mangel an Vitamin B die Ursache der Hypertrophie, dann durfte in dieser Reihe keine Hypertrophie eintreten. Hierzu wurden 6 Tauben benutzt. Dann wurde auch noch eine vierte Versuchsreihe gemacht. In dieser sollten die Tiere nur mit Reis und mit Hefe gefüttert werden. Dabei dürfte keine Avitaminose ausbrechen, und die Tiere sollten sich wie normale benehmen. Diese Versuchsreihe an fünf Tauben ist insofern mißglückt, als die Tiere nicht ganz gesund blieben, weil ihre Ernährung doch ungenügend war. Die Befunde an diesen „latent avitaminösen Tieren“ zeigen aber sehr lehrreiche Übergänge (s. unten).

Die Ernährung der normalen Tiere bestand aus Mais, Brot und Grünfutter. Die avitaminösen Tiere erhielten nur geschälten Reis, der vorher noch autoklaviert wurde. Es wurde täglich 50 g gegeben und das Übriggelassene zurückgewogen. Wenn die Tiere nach einigen Tagen aufhörten zu fressen, so wurden sie gestopft. Temperatur und Körpergewicht wurden öfters kontrolliert. Gewöhnlich erwarteten wir das Auftreten schwerer Krämpfe. Dann wurde das Tier aus der Flügelvene oder der Carotis entblutet. Eine genaue Sektion kontrollierte, ob die Todesursache nicht eine interkurrente Krankheit war.

Organgewichte.

Das Gewicht der folgenden Organe wurde bestimmt: 1. Beide Nebennieren, 2. Pankreas, 3. Thyreoidea, 4. Leber, 5. Gehirn, 6. Herz, 7. Magen. Wir haben also auch das Gewicht von anderen Organen bestimmt, ebenso wie das schon andere Autoren, *Funk*, *Abderhalden* usw., taten. Das Verhalten der Nebennieren mußte so um so auffallender werden. Insbesondere wählten wir ein Organ, dessen Gewicht auch bei starker Abmagerung nicht abnimmt, um einen Standardwert zu besitzen, mit dem die Organgewichte vergleichbar waren. So kann man umgehen, das Organgewicht mit dem ganzen Körpergewicht zu vergleichen. Letzteres nimmt bei Avitaminose um ein Drittel ab. Außerdem beteiligen sich am Körpergewicht die Federn und der Darminhalt, wodurch dieses zu einer sehr unsicheren Zahl wird. Ein Organ, das auch beim Hungern sehr konstant sein Gewicht behält, ist der Augen-Bulbus[1]). Schon die konstante Funktion reiht den Bulbus unter jene Organe, die beim Hungern an Gewicht nicht verlieren können.

[1]) Sein Gewicht betrug im Mittel von 40 Bestimmungen 1,171 g, wobei die Mittel der verschiedenen Gruppen um ± 0,09 g schwanken.

Wir haben also das Gewicht der Nebennieren und zum Vergleich auch jenes des Pankreas in Prozenten des Bulbusgewichtes ausgedrückt.

Der Vergleich findet also gegenüber einem Organ statt, das am Ende des Versuchs dasselbe Gewicht hatte wie am Anfang, als das Tier noch gesund war.

Die Resultate sind in fünf Tabellen zusammengestellt (Tabelle I bis V). Aus Tabelle I, aus Organgewichten von 10 Normaltieren sei hervorgehoben, daß das Durchschnittsgewicht der Tiere 260 g war, das Gewicht der Nebennieren betrug 0,0386 g, d. h. 3,4 Proz. des Bulbus, während das Pankreas 109 Proz. Bulbusgewicht hatte.

Tabelle I. Normale Tiere.

Nr.	Körpergewicht g	Gewicht in g									Relat. Gew. Proz.	
		Nebennieren	Pankreas	Thyreoidea	Leber	Niere	Gehirn	Herz	Magen	Bulbus	Nebennieren	Pankreas
1	287	0,0330	1,5300	—	5,9520	2,4870	1,6516	3,6316	10,6000	0,7306	4,5	209
2	236	0,0434	1,2500	—	4,5500	—	1,9359	3,4850	7,7850	1,0800	4,0	115
3	315	0,0352	0,7300	—	6,1396	1,7474	1,7236	3,4266	7,2426	1,1298	3,1	64
4	288	0,0390	0,9300	—	3,8888	1,3922	1,7026	2,7250	7,5444	1,0714	3,6	87
5	232	0,0572	0,6400	—	5,9034	1,5990	2,0320	2,6930	8,2470	1,2280	4,6	52
6	—	0,0504	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
7	282	0,0362	1,0808	0,0450	10,9200	—	1,8300	2,8345	10,3500	1,0936	3,3	99
8	250	0,0383	1,1396	0,0560	8,6810	—	1,9154	3,4380	10,5800	1,0704	3,5	106
9	279	0,0260	1,8870	0,029	6,1950	—	1,9854	3,9820	9,1950	1,2234	2,1	158
10	226	0,0280	1,0466	0,029	4,4570	—	1,9720	3,8980	9,1660	1,1236	2,4	93
Mittel	260	0,0386	1,1371	0,0397	6,2985	1,8064	1,8609	3,3459	8,9677	1,0834	3,4	109

In Tabelle II sind dieselben Daten für die avitaminösen Tauben verzeichnet. Bei allen Tieren hat das Körpergewicht abgenommen. Im Durchschnitt von 309 auf 231 g. Wesentliche Gewichtsabnahme zeigen die Mittelwerte von Thyreoidea, Pankreas, Leber, Herz, Magen. Keine Gewichtsabnahme zeigt die Niere, Gehirn und Bulbus. Das einzige Organ, dessen Gewicht bedeutend zugenommen hat, ist die Nebenniere. Das absolute Gewicht beträgt im Mittel 0,1125 g. Während sie normal 3,4 Proz. des Bulbus betragen, sind sie hier auf durchschnittlich 9,6 Proz. gewachsen, also auf das Dreifache. Zum Vergleich sei das Pankreasgewicht angeführt, das von 1,1371 g auf 0,6856 g bzw. von 109 Proz. auf 55 Proz. Bulbusgewicht, also auf die Hälfte abnahm.

Die Grenzwerte für das Gewicht der Nebennieren liegen bei normalen Tauben zwischen 0,0260 und 0,0572 g. Bei avitaminösen Tieren zwischen 0,0540 und 0,2036 g. Während bei den normalen Tieren nur 3 von 10 über dem Mittelwert liegen und somit in die Nähe der niedrigsten avitaminösen Werte kommen, liegen von den Gewichten der Nebennieren von avitaminösen Tieren unter 19 Fällen nur 2 in der Größenordnung des höchsten normaler Wertes (0,0540 bzw. 0,0586 g). Alle anderen 17 Werte liegen bedeutend höher.

Auch das relative Gewicht der Nebennieren zum Bulbus, welches bei normalen Tieren zwischen 2,1 bis 6,0 Proz. fällt, liegt bei avitaminösen Tieren zwischen 4,2 bis 23,4 Proz. Auch hier fallen nur 2 Werte unter die höchsten normalen Werte.

Nr.	Körpergew. g		Zeit der Fütterung	Gewicht in g									Rel. Gewicht Proz.		Anmerkung
	anfangs	am Ende	Tage	Nebennieren	Pankreas	Thyreoidea	Leber	Nieren	Gehirn	Herz	Magen	Bulbus	Nebenniere	Pankreas	
11	—	—	25	0,1118	0,7700	—	7,8900	—	1,6900	3,3148	8,6400	1,2336	9,1	62	Schwere Ataxie. Tötung durch Verbluten
12	—	—	25	0,0540	—	—	—	—	—	—	—	1,2886	4,2	—	Schwere Ataxie. Tötung durch Verbluten
13	348	225	27	0,2036	0,5000	—	6,2150	—	2,2950	3,6470	6,6300	1,3730	14,8	36	Schwache Ataxie. Liegt. Kollaps. Entblutung
14	282	255	19	0,1538	0,4954	0,0292	7,4838	—	2,5252	3,7248	6,5182	0,6570	23,4	75	Morgens schwer. Krämpfe. Spontaner Tod. Sogleich danach Sektion
15	330	225	23	0,0638	0,8278	—	6,0080	—	1,9538	3,1600	7,0420	1,2696	5,0	65	Seit 2 Tagen schwache Ataxie. Tötung durch Verbluten
16	346	227	20	0,1699	0,4432	0,0298	5,1426	—	2,3876	3,1392	8,5180	1,2472	13,6	35	Schwere Krämpfe. Verbl.
17	370	254	27	0,1274	0,6800	—	6,4100	—	2,2600	3,1000	5,6700	1,2004	10,6	56	Seit 2 Tagen Lähmungen. Tötung d. Verbluten
18	340	235	23	0,1162	0,6998	0,0304	5,9910	—	2,3644	2,7028	6,4214	1,2612	9,2	55	Vorm. 11h die ersten Krämpfe. Um 5h verbl.
19	317	272	28	0,0884	0,5354	0,0100	5,4040	—	2,3760	2,9650	6,8418	1,2496	7,0	42	Sitzt traurig mit gesträubten Federn. Keine Lähmungen. Verblutung
20	268	264	25	0,0586	0,5906	—	6,5628	—	1,8948	2,6300	7,1100	1,1082	5,2	43	Seit 4 Tagen schwache Ataxie. Verblutung
21	322	200	34	0,0904	0,6620	—	6,8000	2,0700	1,8796	2,2400	6,0206	1,0970	8,2	60	Ataxie. Verblutung. 37,3°. Vom 13. Tage an gestopft
22	315	247	30	0,1848	0,9092	—	5,5756	1,7222	1,9315	2,7104	5,6228	1,2539	14,7	72	Ißt vom 11. Tage an nicht. 39,4°. Schwere Lähmungen u. Krämpfe. Verbl.
23	342	230	58	0,0794	0,8060	—	7,2416	2,9730	—	2,5642	7,2752	1,0746	7,3	55	Vom 9. Tage an gestopft. Ataxie. Krämpfe. 39,1°. Verblutet
24	240	204	15	0,0780	0,6766	—	5,7988	2,3596	2,1232	2,9250	6,3740	1,1138	7,0	60	Gestopft vom 5. Tage an. 2 Tage lang schwere Krämpfe. 37,5°. Spontaner Tod
25	280	201	21	0,1440	0,6350	—	3,6340	1,5460	1,8230	2,1580	5,4780	1,1840	12,1	53	Frißt bis zuletzt. Ataxie. Krämpfe. Verbl.
26	233	172	18	0,1084	1,0190	—	4,5910	1,4710	2,0998	2,4210	4,4180	1,2250	8,8	83	Plötzlich auftr. Krämpfe. Ataxie. Verblutung.
27	357	260	18	0,1514	0,7990	—	6,7636	1,5380	2,1658	2,4327	7,9270	1,2194	12,4	65	Vom 8. Tage an gestopft. 39,4°. Lähm. u. Ataxie. Spontaner Tod.
28	285	186	30	0,0826	0,5720	—	6,1972	1,6708	2,0880	2,5688	4,6682	1,7712	4,6	32	Ataxie. Spontaner Tod
29	290	270	—	0,0738	0,7140	—	5,0950	—	2,2006	3,9400	6,0560	1,2360	5,9	57	Vom 23. Tage an gestopft. Ataxie. Spontaner Tod
Mttl.	309	231	—	0,1125	0,6856	0,0248	6,0446	1,9188	2,1210	2,9079	6,5128	1,2138	9,6	55	

Wenn man die starke Abnahme der anderen Organe betrachtet, speziell die des Pankreas und der Thyreoidea, so wird man mit Recht vermuten, daß der Nebenniere hier eine ganz spezielle wichtige Rolle zukommt. Immerhin zeigen sich sowohl im absoluten wie relativen Gewicht der Nebennieren große Differenzen. Wir können keine Anhaltspunkte dafür geben, woher das stammt. *McCarrison* gibt an, daß bei ödematöser Beriberi die Nebennieren stärker vergrößert sind als bei trockener. Wir konnten keine Ödeme an unseren Tieren bemerken.

Tabelle III zeigt die Ergebnisse der Tierreihe B. Diese Tiere hungerten, erhielten aber täglich eine Pille, bestehend aus 2 g lufttrockener Hefe, die bekanntlich sehr reich an Vitamin B ist. Es war behauptet worden, daß die Nebennieren-Hypertrophie auch bei hungernden Tieren vorkommt. Nun mangelt es aber diesen ja auch an Vitamin B. Es ist also möglich, daß auch bei diesen nur der Mangel an Vitamin B den Anstoß zur Hypertrophie gibt. Wurde diesen Tieren jedoch Hefe gegeben, so war zu erwarten, daß jetzt die Hypertrophie trotz der Inanition ausbleibt. Das war tatsächlich der Fall.

Trotzdem das Körpergewicht dieser Tiere während des 4 bis 9 Tage langen Hungerns sehr bedeutend, von 316 auf 195 g, abgenommen hat, hat das Gewicht der Nebennieren nicht zugenommen. Es beträgt im Mittel 0,0367 g bzw. 3,1 Proz. Bulbusgewicht, ist also unverändert.

Durch diese Versuchsreihe ist der Beweis erbracht, daß die Ursache der Hypertrophie der Nebennieren beim Hungern auch der Mangel an Vitamin B ist. Verabreichung desselben verhindert die Hypertrophie vollständig.

In dieser Versuchsreihe haben wir versucht, Tauben nur mit Reis und Hefe am Leben zu erhalten. Letztere wurde in lufttrockenen Pillen von 2 g Gewicht in den Schnabel gegeben. *Abderhalden* hat auf diese Weise Tauben viele Monate lang am Leben erhalten. Wir erwarteten, daß diese Tiere gesund bleiben würden und auch keine Veränderungen der Nebennieren zeigten. Es gelang uns aber nicht, die Tiere ganz gesund zu erhalten. Wahrscheinlich waren unsere Hefepillen weniger vitaminhaltig als die von *Abderhalden* (leider haben wir versäumt, das Trockengewicht zu bestimmen).

Wir müssen hier die einzelnen Tiere besonders besprechen. Nr. 38 war vom 4. November bis 29. Januar mit Reis und Hefe gefüttert worden. Es starb, ohne daß Krämpfe und Lähmungen aufgetreten wären. In den letzten 25 Tagen hat sich auch das Körpergewicht nicht vermindert, dagegen sank in der letzten Zeit die Temperatur.

Nr. 40 war seit 4. November gefüttert worden und bekam trotz der Hefefütterung allerdings erst nach 80 Tagen am 24. Januar typische Krämpfe. Eine große Dosis Hefepillen brachte die Krämpfe zum Verschwinden. Am 27. Januar wurde ein Tremor der Flügel beobachtet. Trotz normaler Körpertemperatur befand sich dieses Tier augenscheinlich in einem Zustand latenter Avitaminose, immer an der Grenze des Ausbruches der Krämpfe. Am 28. Januar wurde es getötet.

Nr. 39 war ebenso gefüttert wie die vorigen und zeigte einmal Krämpfe und Kopfnystagmus. Es muß angenommen werden, daß dieses Tier ebenso wie seine beiden Genossen latent avitaminös war, und es wurde deshalb getötet am 87. Tage der Fütterung.

Nr. 36 und 37 derselben Versuchsreihe wurden bereits am 43. Fütterungstag getötet, ohne daß sie noch Erscheinungen gezeigt hätten. Nr. 37 hat zuletzt stark abgenommen.

Nr.	Körpergewicht g anfangs	Körpergewicht g am Ende	Zeit des Hungerns Tage	Gewicht in g Neben-nieren	Pankreas	Thyreoidea	Leber	Gehirn	Herz	Magen	Bulbus	Rel. Gewicht Proz. Neben-niere	Pan-kreas	Anmerkung
30	425	237	4	0,0584	0,7582	0,0546	6,5830	2,5748	3,2072	10,2600	1,3772	4,2	55	Spontaner Tod
31	355	210	7	0,0460	0,5800	0,0194	5,1450	2,2310	2,7500	7,8810	1,2476	3,6	46	Spontaner Tod
32	310	215	5	0,0322	0,7260	0,0204	4,0400	1,7310	3,8900	8,3500	0,9686	3,3	74	Sehr schwach, deshalb Tötung d. Verbluten
33	275	196	8	0,0186	0,4892	—	3,6020	2,9200	2,2034	5,2890	1,0398	1,7	46	Sehr schwach, deshalb Tötung d. Verbluten
34	270	150	9	0,0127	0,5980	—	4,2682	2,1935	2,1880	5,5650	1,0029	1,2	59	Spontaner Tod
35	263	166	6	0,0526	0,7006	0,0901	4,9400	1,7738	—	6,2300	1,1122	4,7	62	Spontaner Tod
Mittel	316	195	—	0,0367	0,6420	0,0461	4,7630	2,2373	2,8477	7,2625	1,1242	3,1	57	

Tabelle IV. Tiere mit latenter Avitaminose (Reis + Hefe).

Nr.	Körpergewicht g anfangs	Körpergewicht g am Ende	Zeit der Fütterung Tage	Gewicht in g Neben-nieren	Pankreas	Thyreoidea	Leber	Gehirn	Herz	Magen	Bulbus	Rel. Gewicht Proz. Neben-niere	Pan-kreas	Anmerkung
36	221	275	41	0,0397	0,8038	0,0282	5,5797	1,9629	3,7270	5,8960	1,2543	3,2	64	Frißt. Normal. Tötung durch Verbluten
37	336	240	43	0,0916	0,6990	0,0244	6,4240	2,0580	2,9580	6,3050	1,2572	7,3	55	Tötung durch Verbluten
38	265[1])	270	86	0,0618	1,1128	0,0514	11,1226	2,9150	3,8196	6,8126	1,3334	4,6	83	Am 2. I. 39^0, 27. I. $38,9^0$. 29. I. morgens tot aufgefunden. Totenstarr.
39	300[1])	265	87	0,0559	0,6050	0,0432	—	2,0210	3,3170	7,2010	1,2358	4,5	48	2. I. 40^0, 27. I. $40,3^0$. Sitzt mit gesträubten Federn. Angeblich einmal kurze Krämpfe. Tötung durch Verbluten
40	263[1])	225	87	0,0646	0,7500	0,0537	6,8642	1,9346	2,6760	4,8370	1,2312	5,2	60	Gefüttert seit 3. XI. Am 24. I. plötzlich Krämpfe. Hierauf 3 g Hefe. Darauf wieder wohl. 27. I. 40^0. Tötung durch Verbluten
Mittel	—	255	—	0,0627	0,7941	0,0401	7,4976	2,1783	3,2995	6,2103	1,2623	5,0	62	

[1]) Dieses Gewicht wurde am 60. Tage bestimmt. Das Anfangsgewicht ist unbekannt.

Bei allen diesen Tieren ist also zwar die Beriberi nicht zur gewohnten Zeit ausgebrochen, sondern sie konnten zum Teil drei- bis viermal so lange am Leben erhalten bleiben, dennoch zeigen die erwähnten Befunde, daß die Tiere nicht genug Vitamin B erhielten, und wir betrachten sie deshalb mit Recht nicht als normale gesunde, sondern als latente avitaminöse Tiere.

Aus diesem Grunde werden auch die in Tabelle IV zusammengestellten Resultate verständlich. Aus diesen geht hervor, daß die Nebennieren bei allen diesen Tieren (außer bei Nr. 36) an Gewicht zugenommen haben, im Mittel auf 0,0627 g, relativ von 3,4 Proz. auf 5,0 Proz. Diese Zunahme liegt zwischen den normal und den schweren Beriberi-Werten. Sie sind nicht so hoch wie letztere, entsprechend dem leichteren Zustand der Tiere.

Aus den Mittelwerten aller vier Versuchsreihen ist die Tabelle V zusammengestellt, in welcher zum Vergleich auch die Mittelwerte für das Pankreas angegeben sind.

Tabelle V.

Mittelwerte.

Versuchsreihe	Körpergewicht		Nebennierengewicht		Pankreasgewicht	
	am Anfang g	am Ende g	absolut g	relativ Proz.	absolut g	relativ Proz.
A. Normale Tiere . . .	260	—	0,0386	3,4	1,1371	109
B. Hungernd, mit Vitamin B. (Hefe) . .	316	195	0,0367	3,1	0,6420	57
C. Latente Avitaminose	?	255	0,0627	5,0	0,7941	62
D. Schwere Avitaminose	309	231	0,1125	9,6	0,6856	55

Es geht sehr deutlich hervor, daß gegenüber den Normalen bei Hunger mit Vitamin-B-Fütterung die Nebennieren normal bleiben, bei latenter Avitaminose wenig, bei schwerer jedoch fast aufs Dreifache hypertrophieren. Das Körper- und Pankreasgewicht nimmt umgekehrt in den drei letzteren Fällen ab.

Der Adrenalingehalt der Nebennieren.

An den Nebennieren der oben besprochenen Tiere wurden Adrenalinbestimmungen gemacht. Wir haben, ebenso wie *Mc Carrison*, eine biologische und eine chemische Methode benutzt. Die erstere war die Methode von *Laewen-Trendelenburg*[1]), die zweite die von *Folin, Cannon* und *Denis*[2]) angegebene kolorimetrische Methode. Zur letzteren benutzten wir als Vergleichslösung frische Adrenalinlösung (*Heisler*). Es wurde ein Dubosque-Kolorimeter benutzt. An reinen Adrenalinlösungen gaben beide Methoden gut übereinstimmende Resultate. Dagegen waren die Resultate an Nebennierenextrakten gelegentlich sehr verschieden, was daher stammen dürfte, daß auch andere Substanzen diese Reaktionen geben. Vor kurzem hat im pharmakologischen Institut in Rostock *Maiweg*[3]) gleichfalls gefunden, daß die kolorimetrische Methode „bei der Prüfung von Nebennierenauszügen

---

[1]) *Trendelenburg*, Arch. f. exper. Path. u. Pharm. **179**, **154**, **1915**.
[2]) *Folin, Cannon, Denis*, Amer. Journ. of Physiol. **18**, **476**, **1912**.
[3]) *Maiweg*, diese Zeitschr. **184**, 292, 1922.

sehr ungenaue Resultate gibt..." Die Nebennieren wurden teils nach *Biedl*[1]) mit 2 Proz. Essigsäure 24 Stunden lang extrahiert (Tier Nr. 21 bis 29). Vor der Prüfung am Froschpräparat wurde die Lösung mit n/10 NaOH auf p_H 7,4 gebracht. Sonst wurde nach *Folin* mit n/10 HCl extrahiert, mit Pb-Acetat gefällt, aufgekocht und verdünnt und derselbe Extrakt nach beiden Methoden untersucht.

Tabelle VI.

Adrenalingehalt nach Methode *Trendelenburg.*

Normale Tiere.

Nr.	Adrenalin	
	mg	Nebenniere Proz.
45	0,099	0,29
46	0,150	0,61
47	0,086	0,36
48	0,075	0,22
49	0,115	0,37
6	0,180	0,36
7	0,077	0,21
8	0,057	0,15
10	0,059	0,21
Mittel	0,100	0,31

Avitaminöse Tiere.

Nr.	Adrenalin	
	mg	Nebenniere Proz.
11	0,180 ?	0,16 ?
13	0,078	0,04
15	0,031	0,05
19	0,142	0,16
21	0,100	0,11
22	0,020	0,01
23	0,017	0,02
24	0,002	0,002
25	0,227 ?	0,16 ?
26	0,009	0,01
27	0,002	0,01
28	0,00001	0,0001
29	0,250	0,34
Mittel	0,081	0,08

Hungertiere mit B-Vitamin.

Nr.	Adrenalin	
	mg	Nebenniere Proz.
30	0,050	0,09
32	0,125	0,39
33	0,125	0,62
34	0,500	0,39
35	0,044	0,08
Mittel	0,079	0,32

Latente Avitaminose

Nr.	Adrenalin	
	mg	Nebenniere Proz.
36	0,075	0,19
37	0,075	0,08
38	0,025	0,04
39	0,033	0,06
Mittel	0,052	0,09

Tabelle VI zeigt die Resultate in allen vier Versuchsreihen nach der Methode von *Laewen-Trendelenburg*, und Tabelle VII jene nach der Methode von *Folin*. In Tabelle VIII sind alle Mittelwerte zusammengefaßt.

Wir fanden bei normalen Tieren 0,31 bzw. 0,32 Proz. Adrenalin. Dieser Wert stimmt mit den in der Literatur bekannten Werten bei anderen Tierarten gut überein. Die Adrenalinmengen bei schwererer Avitaminose sind nach beiden Methoden etwas geringer als normal. Ganz sicher ist, daß sich durchaus keine Vermehrung des Adrenalingehaltes nachweisen ließ.

[1]) *Biedl*, Innere Sekretion 1, 428, 2. Aufl.

Tabelle VII. Adrenalingehalt nach der Folin-Methode.

Normale Tiere.

Nr.	Adrenalin mg	Adrenalin Nebenniere Proz.
45	0,104	0,30
46	0,176	0,72
47	0,091	0,38
48	0,092	0,27
49	0,075	0,24
6	0,098	0,19
7	0,081	0,22
8	0,056	0,15
9	0,135	0,52
10	0,059	0,21
Mittel .	0,097	0,32

Avitaminöse Tiere.

Nr.	Adrenalin mg	Adrenalin Nebenniere Proz.
11	0,077 ?	0,07
12	0,032	0,06
13	0,073	0,04
14	0,039	0,03
15	0,042	0,07
16	0,052	0,03
18	0,086	0,07
19	0,145	0,17
20	0,043	0,07
Mittel	0,065	0,06

Hungertiere mit B-Vitamin.

Nr.	Adrenalin mg	Adrenalin Nebenniere Proz.
30	0,052	0,09
32	0,100	0,31
33	0,106	0,57
34	0,079	0,63
35	0,120	0,23
Mittel	0,091	0,36

Latente Avitaminose.

Nr.	Adrenalin mg	Adrenalin Nebenniere Proz.
36	0,104	0,26
37	0,108	0,12
38	0,053	0,09
39	0,166	0,30
40	0,101	0,16
Mittel	0,105	0,18

Tabelle VIII. Mittelwerte.

	mg Adrenalin nach		Proz. Adrenalin in der Nebenniere nach	
	Trendelenburg	*Folin*	*Trendelenburg*	*Folin*
Normale Tiere	0,100	0,097	0,31	0,32
Hungertiere mit B-Vitamin	0,079	0,091	0,32	0,36
Latente Avitaminose . . .	0,052	0,105	0,09	0,18
Schwere Avitaminose . .	0,081	0,065	0,08	0,06

Vergleichen wir unsere Befunde mit denen von *McCarrison*[1]), so finden wir, daß er nach der Methode von *Folin* für den normalen Adrenalingehalt 0,0554 g findet, gegenüber unserem Wert von 0,097 g, d. h. 0,24 Proz. gegenüber unserem 0,32 Proz. Die Übereinstimmung ist also genügend, jedoch liegen unsere Werte höher.

Nun findet er aber bei trockener Beriberi 0,076, bei hydropischer Beriberi 0,121 g Adrenalin, während wir bei latenter Form 0,105, bei schwerer 0,065 g finden. Hier besteht also ein Gegensatz zwischen unseren Zahlen. Denn während er besonders bei der ödematösen Form gegenüber seinen

[1]) Ber. ges. Physiol. 4, 63.

Normalwerten eine starke Zunahme findet, tritt bei uns umgekehrt eher eine Abnahme ein, keinesfalls eine Zunahme. Es ist möglich, daß wir deshalb keine Steigerung sahen, weil wir auch keine Ödemformen sahen, die aus unbekannten Gründen bei *Mc Carrison* die Hälfte aller Erkrankungen betrugen. Aber es scheint überhaupt fraglich, ob die Unterschiede so groß sind, daß man daraus weitgehende Folgerungen ziehen darf. Da es sich um Mittelwerte aus sehr verschiedenen Einzelbestimmungen handeln dürfte, so scheint uns ein Zweifel berechtigt. Prozentual auf das Gewicht der Nebennieren berechnet, sinkt bei Beriberi der Adrenalingehalt auch in den Versuchen von *Mc Carrison* von 0,24 auf 0,18 Proz.

In unseren Versuchen sinkt der prozentuelle Adrenalingehalt deshalb so stark, weil, nachdem die Adrenalinmenge sich nicht vermehrt, das Nebennierengewicht dagegen auf das Dreifache steigt, selbstverständlich der prozentuelle Adrenalingehalt sich stark vermindern muß; daher kommt es, daß wir bei schwerer Avitaminose nur 0,08 bzw. 0,06 Proz. Adrenalin finden.

Das Verhalten der Adrenalinbildung in unseren Versuchen weist also durchaus nicht auf eine Mehrbildung von Adrenalin. Im Gegenteil, unsere Befunde bei Mangel an Vitamin B zeigen dasselbe Verhalten, wie es *Rondoni* und auch *Mc Carrison* beim experimentellen Skorbut gefunden haben. Hypertrophie mit Abnahme des Adrenalins. Auch die Kranken von *Peiser* usw. zeigten Abnahme des Adrenalingehaltes. Die Ursache der scheinbaren Zunahme des absoluten Adrenalingehaltes bei *Mc Carrison* stammt also daher, daß er für normale Tiere einen zu niedrigen Gehalt an Adrenalin angibt.

Sicher ist, daß typische experimentelle Beriberi der Tauben mit Hypertrophie der Nebennieren, aber ohne Mehrbildung von Adrenalin einhergehen kann. Bezüglich der Ödeme verfügen wir über keine Erfahrungen. Die Nerven- und Stoffwechselerscheinungen treten aber in bekannter Weise auf, ohne daß der Adrenalingehalt vermehrt wäre.

Es ist sehr gut denkbar, daß in unseren Versuchen das Mark seinen normalen Adrenalingehalt behielt, was sich aus der ziemlichen Konstanz des Gehaltes folgern läßt. *Wenn die Hypertrophie nur die Rinde betrifft, die kein Adrenalin bildet, so wird der prozentuale Adrenalingehalt der ganzen Nebenniere sich vermindern.* Es sind Anhaltspunkte dafür vorhanden, daß die Hypertrophie sich in erster Linie auf die Rindensubstanz bezieht, doch ist das noch unentschieden.

Dieser letzteren Unsicherheit gemäß können wir uns zwei verschiedene Möglichkeiten denken. Entweder ist eine Hypertrophie der ganzen Nebenniere vorhanden, wobei im Gegensatz zu *Mc Carrison* eine Verminderung der Adrenalinbildung einhergeht, oder aber *die Adrenalinbildung ist ungestört, dagegen hypertrophiert die Rinde,* und die prozentuelle Abnahme des Adrenalins ist nur scheinbar. Keine Anhaltspunkte waren in unseren Versuchen für die Annahme einer Mehrproduktion von Adrenalin. Zur Beurteilung des Zusammenhangs zwischen den Ursachen und Erscheinungen der Beriberi und der Hypertrophie der Nebennieren muß vor allem entschieden werden, ob tatsächlich nur die Rinde hypertrophiert. *Dann fällt die Frage nach der Bedeutung dieser Hypertrophie zusammen mit dem noch ungeklärten Problem der Funktion der Nebennierenrinde*[1]. In dieser Richtung werden weitere Untersuchungen ausgeführt.

---

[1]) *S. Verzár* und *Beznák,* Mitt. d. wiss. St. Tisza-Gesellsch. in Debreczen 20. III. 1923. Hier wurde diese Theorie entwickelt.

Zusammenfassung.

1. Die Nebennieren von Tauben vergrößern sich in Bestätigung des Befundes von *McCarrison* bei experimenteller Beriberi (Mangel an Vitamin B) auf das Zwei- bis Dreifache.

2. Das Körpergewicht, sowie das Gewicht von Pankreas, Thyreoidea, Leber, Magen nimmt stark ab.

3. Zum Vergleich wurde ein Organ gewählt, dessen Größe auch bei Inanition konstant bleibt, der Bulbus. Die Nebennieren ändern ihr Gewicht im Verhältnis zu diesem von 3,4 auf 9,6 Proz.

4. Die Hypertrophie der Nebennieren beruht nicht auf Inanition. Denn wenn man die Tiere hungern läßt und nur mit Hefe, als Quelle von Vitamin B, füttert, so tritt der Tod ein, ohne daß es zur Hypertrophie kommt. Die Ursache ist also der Vitaminmangel.

5. Im Gegensatz zu *McCarrison* nahm der Adrenalingehalt der Nebennieren nicht zu, sondern eher ab. Das wurde sowohl nach *Laewen-Trendelenburg*, als kolorimetrisch nach *Folin* gezeigt. Das Wesen der Beriberi hat also nichts mit einer Adrenalinmehrproduktion zu tun.

6. Dagegen wird auf eine Rolle der Rindensubstanz hingewiesen.

Die Stoffwechsel-Regulation durch Säure bei Bac. coli comm.

Von

F. Verzár, J. Nábráczky und V. Szányi.

(Aus dem Institut für allgemeine Pathologie der Universität in Debreczen.)

(Eingegangen am 29. Juni 1923.)

Mit 4 Abbildungen im Text.

Einer der wichtigsten Faktoren der Regulation von Enzymreaktionen, ebenso wie von komplizierteren Stoffwechselvorgängen bei niederen und höheren Organismen ist bekanntlich die Reaktion des Milieus.

Das Wachstum und der Stoffwechsel von Bakterien sind ein vorzügliches Objekt zum Studium dieses Einflusses. Schon *Michaelis* und *Marcora* (1) haben angegeben, daß der Regulator für die Milchsäurebildung aus Milchzucker bei Bac. coli comm. die H'-Konzentration der Lösung ist und daß dieser Prozeß stehenbleibt, wenn die H'-Konzentration $1,10^{-5}$ erreicht hat. *Verzár* und *Bögel* (2) (3) haben eingehende Untersuchungen über die Stoffwechselregulation bei Bac. coli gemacht und dabei auch die Säurebildung untersucht. Sie fanden durch Titration unter gleichen bzw. vergleichbaren Bedingungen sehr konstante Endaziditäten. Bei verschiedener Ausgangsreaktion bleibt die Säurebildung aus Traubenzucker, wie aus ihren Kurven hervorgeht, bei derselben titrierten Azidität stehen. Bei verschiedenen Nährböden und verschiedenen Stämmen fanden sie oft Unterschiede in der Endazidität, was aber bei ihrer Fragestellung nicht störte. Die Rolle der H'-Konzentration wurde nicht untersucht.

Demgegenüber hat *Whyatt* (4), ohne unsere Versuche zu kennen, gefunden, daß „eine Änderung in der Anfangsreaktion des Mediums auch eine Änderung der Endreaktion der Kultur zur Folge hat, welche in derselben Richtung liegt, aber von geringerer Größe ist". Eine charakteristische Endreaktion gebe es also gar nicht. Auch sonst wurde wiederholt bemerkt, daß dasselbe Bakterium in verschiedenen Nährböden und bei verschiedenen Gelegenheiten nicht bis zur selben H'-Konzentration Säure bildet, so daß Zweifel an der Bedeutung dieser wuchsen. Es war ja möglich, daß auch die undissoziierte Säure oder das Säureanion von Einfluß ist (siehe *van Dam*) (4a). Man kann Versuchsanordnungen treffen, die ohne weitere Analyse ganz in letzterer Richtung erklärbar sein könnten (siehe z. B. Versuch II dieser Arbeit).

In den letzten Jahren haben einige amerikanische Arbeiten von *Clark* (5) *Jones* (6), *Kligler* (7) und *Wolf* (8) sowie *Howard Brown* (9) diese Frage wesentlich geklärt, indem sie auf die Pufferung der Nährlösung hinwiesen und zeigten, daß diese von wesentlichem Einfluß auf die Säurebildung ist. Letzterer hat den Puffergehalt der Nährlösungen für so wesentlich gehalten, daß er ein besonderes Maß hierfür, den „Pufferindex" einführte.

Bei der großen allgemein biologischen Bedeutung, welche der Stoffwechselregulierung durch Säure zukommt, haben wir diese Frage so untersucht, daß wir eine Versuchsanordnung wählten, die in übersichtlicher, geradezu schematischer Weise die Wirkung der Puffersubstanzen auf die Größe der Säurebildung demonstrieren und eine sichere Entscheidung zulassen sollte, ob die $H^{\cdot}$-Konzentration der Regulator der Säurebildung ist. Es sollte die Säurebildung aus Traubenzucker in pufferarmen und pufferreichen Lösungen geprüft werden.

Zu diesem Zwecke wurden Versuche an Bac. coli comm. gemacht, dessen Säurebildung aus Traubenzucker untersucht wurde. Als Nährboden wurde gewöhnliche Laboratoriumsbouillon benutzt, die aus Fleischbrühe aus 500 g Fleisch. auf 1000 ccm Wasser und dazu 10 g Pepton und 5 g NaCl hergestellt war. Zu diesem pufferarmen Nährboden wurde dann, um einen pufferreichen Nährboden zu haben, in manchen Versuchen 1 proz. NaH_2PO_4 hinzugesetzt. Als Quelle zur Säurebildung wurde Traubenzucker gewählt. Mittels n NaOH bzw. n HCl wurde sowohl die pufferarme als die pufferreiche Lösung auf verschiedene Azidität gebracht.

Unsere Versuche sind an verschiedenen Kolistämmen in 13 Versuchsreihen ausgeführt, von denen jede Bestimmungen an zahlreichen Proben mit verschiedener Ausgangsreaktion enthält. Als Beispiel werden, da die Versuche ganz übereinstimmende Resultate gaben, nur vier Versuchsreihen an Stamm III mitgeteilt. Die Versuchsresultate sind in Kurvenform wiedergegeben. Es wurde immer so vorgegangen, daß fünf bis sechs Proben derselben Bouillon teils mit, teils ohne Puffer auf verschiedene Reaktion gebracht und dann bei 37° C gezüchtet wurden. Nach 1, 2, 3 und 4 Tagen wurde dann die Azidität gemessen.

Die Titrationsazidität wurde mit n/10 NaOH (bzw. die Alkalität am Anfang mit n/10 HCl) bestimmt. In den Kurven ist sie in Kubikzentimetern n/10 NaOH bzw. HCl auf 100 ccm Nährlösung ausgedrückt. Als Indikator wurde Phenolphthalein benutzt und bis zur Kochbeständigkeit der Farbe titriert. Oberhalb der O-Abszisse bedeutet sauer, unterhalb alkalisch.

In einer zweiten Probe wurde in jeder Kultur die $H^{\cdot}$-Konzentration nach der kolorimetrischen Methode von *Michaelis* (10) bestimmt. In zehnfacher Verdünnung ist das trotz der Eigenfarbe der Bouillon sehr gut möglich. Es muß bemerkt werden, daß eine elektrometrische

Bestimmung der H˙-Konzentration von Kolikulturen keine richtigen Resultate gibt. Die Lösungen enthalten H_3N und H_2S, bei deren Gegenwart eine elektrometrische Messung bekanntlich nicht möglich ist [*S. Michaelis* (11), S. 163]. An gewöhnlicher unbeimpfter Bouillon erhält man vollkommen übereinstimmende Resultate zwischen kolorimetrischer und elektrometrischer Messung. Dagegen nicht an einige Tage alten Kolikulturen. Elektrometrische Messungen sind hier nicht zu benutzen.

Wir haben unsere kolorimetrische Methodik beständig doppelt geprüft. Erstens an Acetatgemischen nach *Michaelis*, die gleichzeitig elektrometrisch gegenüber einer n KCl-Elektrode bestimmt wurden. Zweitens nach *Kolthoff* (12) mit Pufferlösungen von bestimmter H˙-Konzentration, deren Reaktion zum Vergleich auch kolorimetrisch bestimmt wurde.

Die folgenden Versuchsbeispiele zeigen nun, wie sich die Säurebildung bei verschiedener Ausgangsreaktion im pufferarmen und pufferreichen Nährboden verhält.

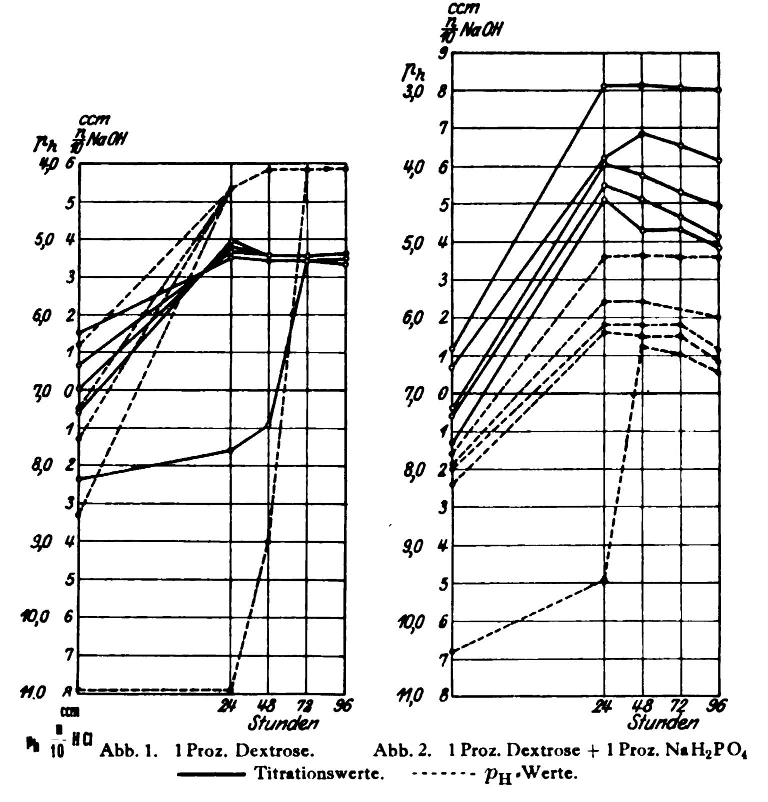


Abb. 1. 1 Proz. Dextrose. Abb. 2. 1 Proz. Dextrose + 1 Proz. NaH_2PO_4
——— Titrationswerte. ------- p_H-Werte.

Abb. 1 gibt die Resultate einer Versuchsreihe wieder in gewöhnlicher, 1 Proz. Dextrose enthaltender Bouillon ohne Pufferzusatz. Aus den Kurven ist sowohl die Änderung der Titrationswerte (ausgezogene Kurven) als

auch die Änderung der H˙-Konzentration (gestrichelte Kurven) ersichtlich. Nach 24 bis 48 Stunden wird ein Endwert erreicht. Die Titrationswerte entsprechen etwa 3,5 ccm n/10 NaOH auf 100 ccm Bouillon. Die H˙-Konzentration betrug $p_H = 4{,}08$.

Ein etwas abweichendes Verhalten zeigt nur die in sehr alkalischer Ausgangsreaktion gezüchtete Kultur. Dieses abweichende Verhalten wird auch in allen späteren Versuchen beobachtet. Hier zeigt sich in den ersten 24 Stunden eine derartige Verlangsamung des Stoffwechsels (Verlangsamung des Wachstums), daß es erst viel später als in den anderen Versuchsreihen zu einer endgültigen Säurebildung kommt. Dann aber werden auch hier genau dieselben Endwerte erreicht wie bei den anderen Ausgangsreaktionen. Diese Verzögerung des Wachstums hat für unsere spezielle Fragestellung hier keine Bedeutung.

Während also in pufferarmer Nährlösung eine konstante, titrierte und aktuelle Azidität erreicht wird, gestalten sich die Verhältnisse ganz anders, wenn die 1proz. Glucose-Bouillon auch reichlich Puffer enthält. In Abb. 2 ist eine Versuchsreihe wiedergegeben, die genau der vorigen entspricht, mit dem einzigen Unterschied, daß noch 1proz. NaH_2PO_4 hinzugesetzt wurde.

Nach 24 Stunden sind auch hier Endwerte erreicht; diese sind aber ganz verschieden von der vorigen Reihe und sind von der Ausgangsreaktion abhängig. Das bezieht sich sowohl auf die Titrationswerte als auf p_H. Die H˙-Konzentration erreicht in keinem Fall den Wert, wie in der vorigen Reihe, sondern die Lösungen bleiben alle alkalischer und um so mehr, je alkalischer die Ausgangslösung war.

Die Kurven der Titrationsazidität zeigen, daß in allen Fällen annähernd gleich viel Säure gebildet wurde. Nach den ersten 24 bis 48 Stunden zeigten die meisten Kulturen eine Alkalibildung, wie sie in den früheren Arbeiten (l. c.) schon beschrieben ist. Dies ist nach dem, was dort ausgeführt wurde, immer der Fall, wenn aller Säure bildender Zucker verbraucht ist, und der Nährboden sauer geworden ist. Tatsächlich enthielt, als die konstanten Endwerte erreicht waren, keine dieser Kulturen mehr Glucose. Demgegenüber war in der vorigen Versuchsreihe in pufferarmer Lösung noch reichlich Zucker vorhanden, als die Säurebildung bereits beendet war.

Wenn man diese beiden Versuchsreihen nebeneinander stellt, so hat man charakteristische Beispiele dafür, was von verschiedenen Autoren beobachtet wurde. Einesteils eine sowohl in Titrationswerten als auch in p_H zu charakteristischen Endwerten führende Säurebildung, und auf der anderen Seite gar keine konstanten Endwerte, sondern solche, die einfach von der Ausgangsreaktion abhängen. Man könnte glauben, daß der Prozeß ungehemmt von der H˙-Konzentration abläuft und nur von der gesamten Säuremenge abhängt.

Die Erklärung für dieses Verhalten ist einfach. In Versuch 2 wurde durch das in großem Überfluß vorhandene NaH_2PO_4 alle gebildete Säure gebunden, und die Säurebildung dauerte so lange, bis alle Glucose zu Säure vergärt war, ohne daß dabei alle NaH_2PO_4 gebunden worden wäre. In diesem Falle von extrem starker Pufferung ist es also ganz klar, daß der Endwert einfach von der Ausgangsreaktion abhängt. Ein relativ starker Puffergehalt einer Nährlösung wird also durch Bindung der Säure verhindern, daß die maximale p_H erreicht wird, während andererseits viel mehr Säure gebildet wird als in pufferarmer Lösung. Die Technik hat sich das ja schon

längst zunutze gemacht, wenn sie zwecks Essig- oder Milchsäuregewinnung zu den Nährlösungen $CaCO_3$ hinzusetzt[1]).

Hieraus folgt aber nun auch, daß, wenn so viel Zucker vorhanden ist, daß mehr Säure gebildet werden kann, als das Phosphat binden kann, dann auch in diesen pufferreichen Lösungen solche Säuregrade entstehen werden, die den Vorgang hemmen, ehe noch aller Zucker verbraucht ist. Hierbei muß sich nun zeigen, ob das bei derselben H˙-Konzentration eintritt wie in der pufferarmen Lösung.

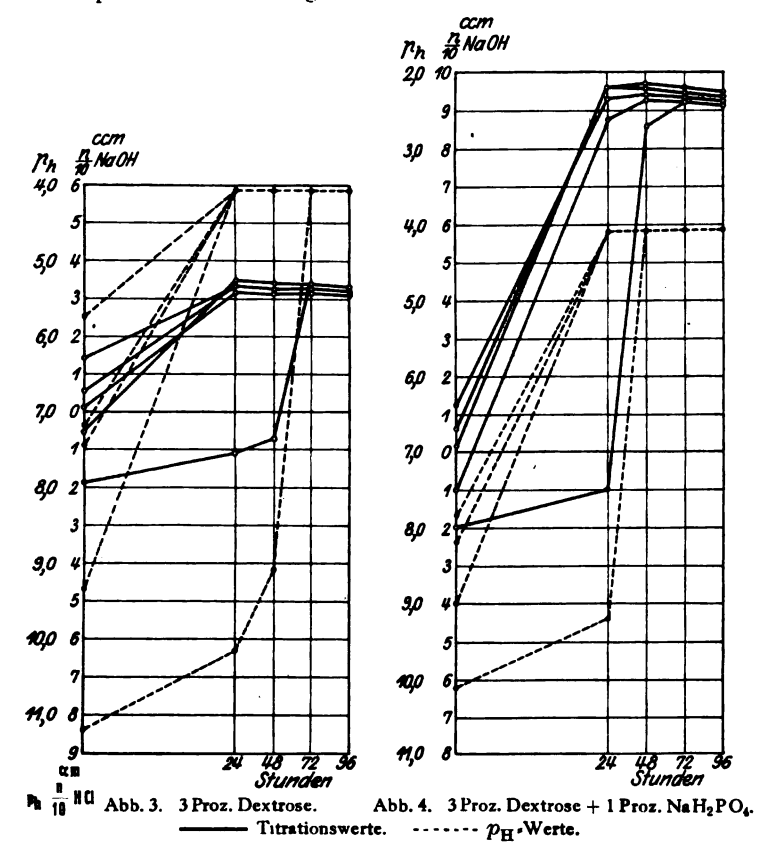


Abb. 3. 3 Proz. Dextrose. Abb. 4. 3 Proz. Dextrose + 1 Proz. NaH_2PO_4.
——— Titrationswerte. ------- p_H-Werte.

Versuch 3 und 4 beweisen, daß tatsächlich die H˙-Konzentration der Regulator ist. In Versuch 3 wurde in gewöhnlicher Nährbouillon 3proz. Glucose gelöst und mit Bac. coli beimpft. Das Resultat ist genau dasselbe wie in Versuch 1 mit 1proz. Glucose. Die Säurebildung bleibt bei p_H 4,08 stehen und bei einer Titrationsazidität, die etwa 3,3 ccm n/10 NaOH auf 100 ccm entspricht. Aus diesem Versuch allein kann noch nichts darauf gefolgert werden, ob die H˙-Konzentration der Regulator ist.

In Versuch 4 dagegen wurde zu der 3proz. Glucosebouillon wieder 1proz. NaH_2PO_4 hinzugesetzt. Bei jeder Kultur, unabhängig von der

[1]) *Lehmann-Neumann*, Bakteriologie, S. 94.

Ausgangsreaktion, wurde nun in vollkommenem Gegensatz zu Versuch 2, aber in Übereinstimmung mit Versuch 1 und 3, wieder dieselbe H˙-Konzentration $p_H = 4,08$ erreicht. Die titrierte Azidität war hier nicht 3,3 ccm n/10 NaOH, sondern 9,5 ccm n/10 NaOH entsprechend. Der einzige konstante Wert in allen diesen Versuchen ist die H˙-Konzentration, bei welcher die Säurebildung aufhört. Ganz unabhängig ist der Prozeß von der gesamten Menge der gebildeten Säure. In Versuch 4 wird um so mehr Säure gebildet, je alkalischer die Ausgangsreaktion war. Es ist klar, daß das deshalb geschah, weil um so mehr Säure durch die Puffer gebunden werden konnte, ohne daß es zu der hemmenden $p_H = 4,08$ kam.

Damit ist bewiesen, daß *die Säurebildung von Bac. coli comm. bei einer bestimmten H˙-Konzentration bei* $p_H = 4,08$ *gehemmt wird. Wenn man einesteils den Puffergehalt, andererseits den Zuckergehalt variiert, so erweist sich lediglich die H˙-Konzentration als Regulator der Säurebildung.* Die Menge der gebildeten Säure hängt nur davon ab, wieviel nötig ist, um bei einem bestimmten Puffergehalt diese maximale Azidität zu erreichen. Die Unterschiede zwischen pufferhaltigen Lösungen und 1- und 3proz. Zucker sind die, daß in ersteren die gebildete Säuremenge bei jeder Ausgangsreaktion nahezu gleich ist, bei letzterer dagegen bei jeder Ausgangsreaktion verschieden und um so größer ist, als die Ausgangsreaktion alkalisch ist.

Die mitgeteilten Versuchsreihen kann man in zwei Gruppen teilen. 1. In pufferarmen Lösungen wird bei jeder Zuckerkonzentration und jeder Ausgangsreaktion die gleiche H˙-Konzentration und auch (nahezu) dieselbe Titrationsazidität erreicht. 2. In pufferreichen Lösungen dagegen hängt das Resultat vom Verhältnis der Zuckermenge zur Puffersubstanz ab. Ist relativ wenig Zucker vorhanden, so bleibt die Säurebildung stehen, wenn der Zucker verbraucht ist, ehe noch die höchste p_H erreicht wird. Ist relativ mehr Zucker vorhanden, so bleibt der Prozeß stehen, wenn die kritische Endreaktion erreicht ist, weil dann die gebildete Säure allen Puffer gebunden hat.

Die endgültige H˙-Konzentration ist dann charakteristisch und konstant für ein Bakterium, wenn der säurebildende Zucker nach Beendigung des Prozesses noch zum Teil übrig bleibt. In diesem Falle wird unabhängig vom Zuckergehalt, unabhängig vom Puffergehalt und unabhängig von der Ausgangsreaktion immer dieselbe H˙-Konzentration erreicht.

Umgekehrt ist die Menge der gesamten gebildeten Säure abhängig von der Zuckermenge, dem Puffergehalt, der Ausgangsreaktion und dem Verhältnis dieser zueinander. So haben schon *Verzár* und *Bögel* gezeigt, daß durch Neutralisieren der Lösung die Säurebildung immer wieder in Gang gebracht werden kann[1]).

Für die praktische Bakteriologie ergibt sich hieraus die Regel, daß, wenn von irgend einem Bakterium bestimmt werden soll, welche charakteristische Azidität erreicht werden kann bei Säurebildung aus Zucker, dann das einfachste Verfahren das ist, das Bakterium *in einer so konzentrierten Zuckerlösung zu züchten, daß nach Beendigung der Säurebildung noch gärfähiger Zucker übrig bleibt.* Auf diese Weise macht man sich unabhängig von dem unbekannten Puffergehalt der Nährlösung, und wird auch die Bestimmung dieses Puffergehaltes überflüssig. Die so erreichte H˙-Konzentration ist charakteristisch für das Bakterium.

---

[1]) l. c., S. 210, Versuch 17.

Der Regulator für die Säurebildung aus Traubenzucker bei Bac. coli comm. ist die H'-Konzentration. Die Säurebildung bleibt, mit der hier benutzten Nährbouillon, stehen bei $p_H = 4{,}08$ (kolorimetrisch).

Wie weitgehend charakteristisch dieser Wert ist, wenn man so vorgeht, beweist der folgende Versuch. Acht verschiedene Kolistämme[1]) wurden in 3proz. Glykosebouillon mit und ohne 1proz. NaH_2PO_4 gezüchtet, also bei einer solchen Zuckerkonzentration, daß auch nach Beendigung des Prozesses immer noch Zucker übrig blieb. In allen acht Kulturen ohne Ausnahme war nach 24 Stunden der konstante Endwert von $p_H = 4{,}08$ erreicht.

Wir möchten nur noch bemerken, daß diese Regel nur ceteris paribus gilt und daß wir derzeit noch nichts darüber aussagen können, wie sich die endgültige p_H verhält, wenn dem Nährboden andere Stoffe beigemischt werden, die das Wachstum der Bakterien beeinflussen, ja selbst dann, wenn Nährbouillon von verschiedener Darstellung benutzt wird. In unseren früheren Versuchen[2]) finden sich Anhaltspunkte dafür, daß dabei auch der Endwert der gebildeten Säure sich ändert. Hierüber soll später berichtet werden. Auch die Befunde von *van Dam*, der bei der Milchsäuregärung in Molke einen Einfluß der H'-Konzentration, daneben aber auch noch verschiedene andere Einflüsse beobachtet, werden von diesem Gesichtspunkt aus beobachtet werden müssen.

Zusammenfassung.

Züchtet man Bac. coli comm. in pufferarmer 1proz. Glucosebouillon, so erreicht die Kultur, unabhängig von der Ausgangsreaktion, p_H 4,08. Dasselbe ist der Fall in 3proz. Glucosebouillon sowohl in pufferarmen, als in pufferreichen Lösungen. Dagegen wird in pufferreicher 1proz. Glucosebouillon je nach der Ausgangsreaktion eine verschiedene p_H erreicht.

Die Menge der gesamten gebildeten Säure hängt davon ab, wann die charakteristische p_H erreicht wird. Das geschieht, wenn aller Puffer gebunden ist, also in pufferarmen Lösungen bei viel geringerer Säurebildung als in pufferreicher Lösung. Alle die beobachteten Fälle, die Abhängigkeit von der Anfangsreaktion ebenso, wie die in anderen Fällen beobachtete Konstanz der titrierten Endwerte erklären sich so.

Für Bac. coli comm. war in einer gewissen Nährbouillon die charakteristische Grenze der H'-Konzentration, bei welcher die Säurebildung aufhörte, p_H 4,08 (kolorimetrisch). Acht verschiedene Kolistämme haben in dieser Bouillon genau diesen selben Wert erreicht.

Die Prüfung der charakteristischen Endreaktion kann unabhängig vom Puffergehalt der Nährlösung erfolgen, wenn man in so konzentrierter Glucoselösung züchtet, daß nach Aufhören der Säurebildung noch Zucker übrig bleibt.

[1]) Sie wurden aus verschiedenen Fäzes isoliert.

[2]) Diese Zeitschr. **108**, 216.

Literatur.

1) *Michaelis* und *Marcora* nach *Michaelis*, Die Wasserstoffionenkonzentration, 1. Aufl., S. 112. — 2) *Verzár*, diese Zeitschr. **91**, 1, 1918. — 3) *Verzár* und *Bögel*, ebendaselbst **108**, 207, 1920. — 4) *Whyatt*, Biochem. Journ. **13**, 1, 1919. — 4a) *van Dam*, diese Zeitschr. **87**, 107, 1918. — 5) *Clark*, Journ. of biol. Chem. **22**, 87, 1915; zit. nach *Howard Brown*. — 6) *Jones*, Journ. exper. Med. **32**, 273, 1920; Journ. inf. dis. **26**, 160; zit. nach *H. Brown*, Ber. ges. Phys. **2**, 145. — 7) *Kligler*, Journ. Bact. **1**, 663, 1916; zit. nach *Howard Brown*. — 8) *Wolf*, Brit. Journ. exper. Path. **1**, 288, 1920; zit. nach *Howard Brown*. — 9) *Howard Brown*, Journ. of Bact. **6**, 1921, Nr. 6. — 10) *Michaelis* und *Gyémánt*, diese Zeitschr. **109**, 165, 1920. — 11) *Michaelis*, Die Wasserstoffionenkonzentration. — 12) *Kolthoff*, Die Bestimmung der Wasserstoffionen mit Indikatoren.

Der Sauerstoffgehalt des Kapillarblutes.

Von

F. Verzár und F. Keller.

(Aus dem Institut für allgemeine Pathologie und der medizinischen Klinik in Debreczen).

(Eingegangen am 29. Juni 1923.)

Während es ohne weiteres möglich ist, beim Menschen venöses Blut zur Gasanalyse zu gewinnen, so macht es andererseits recht bedeutende Schwierigkeiten, arterielles Blut zu untersuchen.

Das gelingt nur durch Arterienpunktion, wobei man gewöhnlich die Arteria radialis herauspräpariert und dann punktiert, eine Methode, wie sie von *Hürter* (1) zuerst beschrieben und seither von *Stadie* (3), *Harrop* (2), *Lundsgaard* (4), *Eppinger* (5), *Barcroft* (6), *Högler* (7) wiederholt benutzt wurde, die aber eben wegen der Größe des Eingriffes niemals einen allgemeineren Eingang in die tägliche klinische Diagnostik erreichen kann. Die Gasanalyse des arteriellen Blutes kann sehr Wichtiges und weitaus mehr aussagen, als jene des venösen Blutes. Der Gasgehalt des letzteren hängt immer von dem jeweiligen Funktionszustand jenes Organs ab, aus welchem es kommt, von der Blutverteilung, von der Strömungsgeschwindigkeit und von der eventuellen Stase in einem gewissen Venengebiet. Demgegenüber wird das arterielle Blut in seiner konstanten Zusammensetzung uns jederzeit darüber Aufklärung geben können, unter welchen Einflüssen die Zellen stehen; das arterielle Blut ist praktisch in allen Arterien zur gleichen Zeit von gleicher Zusammensetzung. Sein O_2-Gehalt hängt davon ab, wie groß der O_2-Druck in der Atmungsluft ist, ob die respiratorische Oberfläche und ob die Durchströmungsgeschwindigkeit der Lunge genügend ist, um das O_2-Defizit in den Geweben auszugleichen. Unter sonst gleichen Verhältnissen bei normalem O_2-Druck wird also die Akkomodationsfähigkeit des Zirkulationsapparats die Bedingung für eine genügende Sättigung des arteriellen Blutes sein. Insbesondere die Beurteilung der verschiedenen Dyspnoen, ob kardial oder pulmonal, sowie ihrer Morphin- und O_2-Therapie, kann kaum der Gasanalyse des arteriellen Blutes entbehren, wie das insbesondere von *Eppinger* (5) und von *Kauders* und *Porges* (8) ausgeführt worden ist. Die Besprechung dieser klinischen Gesichtspunkte gehört aber nicht hierher.

Von dem Wunsche ausgehend, an Stelle der Arterienpunktion durch einen einfacheren Eingriff einen gleichwertigen Einblick in die Zusammensetzung des arteriellen Blutes zu bekommen, wurde schon vor Jahren versucht, das Kapillarblut des Fingers zu analysieren und die Vorarbeiten hierfür, die Ausarbeitung einer entsprechenden Auf-

bewahrungslösung, sind schon in einer Arbeit von *Verzár* und *Gara* (9) niedergelegt worden. *Kauders* und *Porges* haben, demselben Wunsche entsprechend, das Kapillarblut des Ohrläppchens so untersucht, daß sie es in Glaskapillaren aufsogen und seine Farbe mit der Farbe von ebenso aufbewahrtem Blute aus dem Ohrläppchen normaler Menschen verglichen. Eine Hypoxämie, wohl nur solche von beträchtlichem Grade, läßt sich nach ihren Angaben aus der Blutfarbe erkennen. Nur nachträglich erhielten wir Kenntnis von der Mitteilung von *Lundsgaard*, in welcher er das „Kutanblut" des Fingers untersuchte, indem er 4 cm lange Wunden anlegte und in dem ausfließenden Blute denselben O_2-Gehalt fand wie im arteriellen Blute. Eine solche Verwundung dürfte aber wohl auch nicht als diagnostische Methode benutzbar sein.

Wir gingen von dem Gedanken aus, daß die Haut der Fingerspitze jedenfalls eine so geringe Respiration hat, und andererseits ihre Blutdurchströmung so groß ist, daß das in ihr strömende Kapillarblut kaum venöser wird, so daß es praktisch als arterielles Blut zu betrachten sein wird. Daran würde auch das nichts ändern, wenn man konstant 2 bis 3 Proz. weniger O_2 als im arteriellen Blute in diesem Kapillarblute finden würde. Wir dachten, daß eine Bestimmung des O_2-Gehaltes im Kapillarblute deshalb im wesentlichen (wenn auch nicht zahlenmäßig genau) dasselbe aussagen müßte wie die Bestimmung im arteriellen Blute, und suchten deshalb nach einer Methode, mit welcher es einfach möglich wäre, das auszuführen.

Die *Methodik* (10) ist die folgende:

Das Blut wird aus der Fingerspitze ohne Gasverlust aufgefangen in einer Lösung, die es zur Gasanalyse konserviert. Die mit Äther gereinigte Fingerspitze wird mit einer Franckenadel verletzt. Noch ehe das Blut ausfließt, wird die Fingerspitze rasch in ein Spitzglas getaucht, in welchem unter einer 1-cm-Schicht von Paraffinöl 1 ccm der folgenden Lösung sich befinden: 2 Proz. NH_4OH, 5 Proz. Natriumcitrat, 0,5 Proz. Saponin in destilliertem Wasser (siehe *Verzár* und *Gara*, l. c.). In dieser Lösung gerinnt das aus der Fingerspitze fließende Blut durch das Citrat nicht, wird durch das Saponin hämolysiert, sedimentiert deshalb nicht, und die Blutkohlensäure wird durch das NH_4OH gebunden, während der O_2-Gehalt durch das Paraffinöl gewahrt bleibt. Um eine gleichmäßige Verteilung zu beschleunigen, wird man mit einem Glasstab noch vorsichtig mischen können. Die Blutentnahme geschieht also mit keinem größeren Eingriff als z. B. zur Blutkörperchenzählung nötig ist. Man läßt etwa 1 ccm Blut ausfließen, die quantitative Abmessung ist aber ganz überflüssig, denn das Wesentliche ist nicht die Bestimmung des absoluten O_2-Gehaltes, sondern die partielle O_2-Sättigung des Blutes, d. h. wie viel Prozent des Hämoglobins als Oxyhämoglobin vorhanden ist. Diese Bestimmung geschieht in bekannter Weise mit dem Differentialapparat von *Barcroft*[1]). Unter 2 ccm etwa 0,4 proz.

[1]) *Barcroft*, The respiratory function of the blood. Cambridge 1914. Es wäre wohl möglich, auch mit dem *Barcroft*schen Mikroapparat mit 0,1 ccm Blut dasselbe zu bestimmen. S. auch *Pincussen*, Mikromethodik.

NH_4OH-Lösung werden im Rezipienten des Kompensationsmanometers von *Barcroft* 2 ccm der Blutlösung geschichtet. In das Kompensationsgefäß muß genau ebensoviel NH_4OH-Lösung sowie Wasser gegeben werden. Man bestimmt zuerst die O_2-Absorption durch Schütteln und dann die totale O_2-Kapazität mittels Ferricyankaliums. Man liest die Volumänderung *in Skalenteilen ab* und hat nicht auf absolutes Volum umzurechnen. Das Verhältnis der beiden Ausschläge in Prozenten ausgedrückt und von 100 abstrahiert ergibt die partielle O_2-Sättigung des Blutes. Bei Benutzung von 2 ccm der Blutlösung erhält man Ausschläge zu etwa 50 mm, wodurch der Fehler der Methode auf etwa $\pm$ 1 bis 2 Proz. geschätzt werden kann. Umrechnung auf absolute Werte fällt hier fort. Man kann also höchst einfach durch Blutentnahme mit einer Franckenadel, ohne quantitatives Abmessen der Blutmenge und ohne Kalibrierung des Kompensationsmanometers durch Ablesen in Millimeterskalenteilen, die wesentliche Bestimmung der partiellen O_2-Saturation machen.

Nachdem also die Methodik die denkbar einfachste war, blieb zu untersuchen, ob die aus dem Kapillarfingerblut gewonnenen Werte so verwertbar sind, wie die durch Arterienpunktion gefundenen. Wir haben deshalb in einer Reihe von Fällen das Kapillarblut von gesunden und kranken Personen untersucht und berichten hier über die ersten 50 Fälle. Die Befunde sind in Tabelle I und II zusammengestellt.

Die O_2-Sättigung des Kapillarblutes bei 32 Bestimmungen an gesunden Personen (Tabelle I) betrug 98,3 bis 82,4 Proz. Unterhalb 90 Proz. lagen davon neun Fälle; unterhalb 85 Proz. nur vier Fälle, über welche besonders gesprochen werden muß. Werte unterhalb 82,1 Proz. wurden nie beobachtet. Nach *Stadies* erster Mitteilung beträgt die Sättigung des arteriellen Blutes bei Normalen 85 bis 98 Proz. In seiner ausführlichen Mitteilung findet er bei fünf gesunden Personen im Mittel 95 Proz. *Harrop* findet bei Normalen 94,3 bis 100 Proz. Sättigung. (Der letztere Wert ist sicher zu hoch und kommt auch im Tierversuch niemals vor!)

Die Werte unter 85 Proz. kamen vor, wenn die Versuchspersonen blaue Hände hatten. Nr. 22 gab sonst höhere Werte, hatte aber damals cyanotische Hände, die früher erfroren waren. Nr. 29 hatte auch früher „erfrorene“ Hände, und diese waren auffallend dunkelblau, so daß, trotzdem es sich um gesunde, kräftige junge Leute handelt, der Gedanke an eine vasomotorische Störung (als Folge oder als Ursache des Erfrierens der Hände) sowohl bei diesen als bei Nr. 28 möglich ist. Im allgemeinen liegen also die Werte für das Fingerblut zwar weit auseinander, doch innerhalb der Grenzen des arteriellen Blutes. Werte unter 85 Proz. werden aber immer mit Mißtrauen betrachtet werden und können bei lokaler Cyanose der Hände vorkommen.

In Tabelle II sind die Befunde an 20 Kranken der Zirkulations- und Respirationsorgane zusammengestellt.

Tabelle I.

Die normale O_2-Sättigung des Kapillarblutes.

Nr.	Name	Partielle O_2-Sättigung Proz.	Bemerkungen
1	*Ä.*	96,5	20 Jahre alt, gesund
2	*Ä.*	96,1	20 „ „
3	*Sz.*	95,0	20 „ „
4	Dr. *R.*	98,3	25 „ „
5	*Gy.*	88,3	20 „ „
6	*Z.*	91,5	20 „ „
7	*Z.*	91,0	20 „ „
8	*Ma.*	91,2	20 „ „
9	*H.*	97,0	20 „ „
10	*J.*	92,4	20 „ „
11	*K.*	90,5	20 „ „
12	*R.*	94,8	20 „ „
13	*Al.*	94,2	20 „ „
14	*F.*	91,5	20 „ „
15	*M.*	90,1	20 „ „
16	*G.*	95,5	25 „ „
17	*V.*	95,1	36 „ „
18	*V.*	95,9	36 „ „
19	Dr. *K.*	97,7	28 „ „
20	„ „	88,6	28 „ „
21	„ „	92,4	28 „ „
22	„ „	82,4	28 „ „ cyanotische Hände; früher erfroren
23	„ „	87,2	28 Jahre alt, gesund
24	„ „	90,8	28 „ „
25	*Ho.*	88,6	Ischias
26	*B.*	89,8	Gastritis
27	*Mo.*	91,0	Hyperazidität
28	*P. L.*	83,4	24 Jahre alt, nervös
29	*P. F.*	83,0	21 „ „ erfrorene cyanotische Hände
30	*L.*	89,1	Ulcus cruris
31	*Mak.*	92,0	Gesund
32	*H. J.*	84,8	66 Jahre alt, Tetanie
	Mittelwert	91,5 Proz.	

Die fünf Fälle von vollständig kompensiertem Vitium hatten eine partielle O_2-Sättigung, die vollständig dem normalen Mittelwert entspricht (Nr. 33 bis 37). Bei einem stark dekompensierten Vitium (Nr. 42) wurde eine starke Abnahme der partiellen Sättigung gefunden (67,9 Proz.), während die vier Fälle 38 bis 41, die geringe Zeichen der Dekompensation zeigten, Werte ergaben, die zwar unter dem normalen Mittel, aber noch innerhalb jener lagen, die in seltenen Fällen bei normalen Personen auch gefunden wurden, nämlich zwischen 82,9 bis 86,9 Proz.

Anders verhalten sich die Lungenfälle. Bei Fall 44 und 45, wo keine wesentliche Verminderung der respiratorischen Oberfläche der Lunge vorhanden war, liegen die Werte beim normalen Mittel. Da-

Tabelle II.

Die O_2-Sättigung des Kapillarblutes bei Erkrankungen der Zirkulations- und Respirationsorgane.

Nr.	Name	Partielle O_2-Sättigung Proz.	Bemerkungen
33	*Fé.*	93,2	Vitium, kompensiert
34	*R.*	92,0	„ geringe Dekompensation
35	*R.*	89,6	„ „ „
36	*M.*	91,6	„ kompensiert
37	*Mué.* . . .	91,4	„ „
38	*Fei.*	86,9	„ fast kompensiert, geringe Dyspnoe. Aorta Ektasie mit Druck auf die Trachea
39	*Kué.* . . .	86,9	Kompensiertes Vitium; geringe Dyspnoe
40	*Fö.*	83,4	Myodegeneratio; Dyspnoe
41	*N.*	82,9	Aorta vitium. Lungenhypostase. Dispnoe
42	*H.*	67,9	Inkompensiertes Vitium, Hypostase der Lunge; starke Dyspnoe
43	*K.*	83,4	Arteriosclerose; Angina pectoris; Emphysema. Geringe Dyspnoe
44	*Ho.*	92,2	Cat. apic.
45	*D.*	89,9	Tbc. pulm.; peritonitis tbc.
46	*Ka.*	82,0	„ „ geringe Dyspnoe
47	*Fa.*	77,5	Pleuritis bilateralis; nach Punktion; schwere Dyspnoe
48	*S.*	75,9	Emphysema; myodegeneratio, ascites. Dyspnoe
49	*V.*	74,3	Vitium mit Pleuritis; mittlere Dyspnoe
50	*B.*	68,2	Emphysema; bronchiektasia, induratio pulmonum, Dyspnoe
51	*Hu.*	47,3	Pneumonie, pleuritis; Agone
52	*Ba.*	47,0	Emphysema; Bronchiektasie; schwere Dyspnoe

Tabelle III.

Arbeitsversuche an normalen Personen mit Kompensation.

Nr.	Name	Partielle O_2-Sättigung vorher Proz.	nachher Proz.	Bemerkungen	
3	*Sz.*	95,0	95,0	Gesund, Treppenlaufen	
5	*Gy.*	88,3	88,0	„ „	
7	*Z.*	91,0	95,5	„ „	Überkompensiert
8	*Ma.*	91,2	91,5	„ „	
9	*H.*	97,0	94,5	„ „	
10	*J.*	92,4	91,0	„ „	
11	*K.*	90,5	95,0	„ „	Überkompensiert
12	*R.*	94,8	96,7	„ „	
13	*Al.*	94,2	93,2	„ „	
14	*F.*	91,5	92,3	„ „	
15	*M.*	90,1	89,6	„ „	
16	*G.*	95,5	97,7	„ „	Überkompensiert
17	*V.*	95,1	94,1	„ „	
23	Dr. *K.* . . .	87,2	88,2	„ „	
24	„ „ . . .	90,8	90,7	„ „	
26	*B.*	89,8	92,2	Gastritis. Kniebeugen bis zur Ermüdung	
27	*Mo.*	91,0	90,5	Hyperazidität. Kniebeugen bis zur Ermüdung	
29	*P. F.* . . .	83,0	81,3	Gesund, Treppenlaufen	

gegen war in sechs Fällen (Nr. 47 bis 52) bei Pleuritis, Emphysema bzw. Pneumonie die partielle O_2-Sättigung weit unter der normalen, d. h. 77,5 bis 47,0 Proz.

Wir finden also, daß die partielle O_2-Sättigung des Kapillarblutes nur dann unter die normale untere Grenze von 82 Proz. sinkt, wenn entweder primär bei Erkrankungen der Lunge, oder sekundär bei Hypostase der Lunge durch Inkompensation die respiratorische Oberfläche der Lunge vermindert wird.

In zwei weiteren Versuchsreihen haben wir dann weiter den Einfluß von schwerer Arbeit auf die O_2-Sättigung des Kapillarblutes untersucht. Wenn die Leistungsfähigkeit der Atmungs- und Zirkulationsorgane vollkommen ist, so wird auch nach einer schweren Muskelarbeit der Organismus mit einer so vollständigen Kompensation reagieren, daß das arterielle Blut gleichmäßig gesättigt bleibt, wie das aus Tierversuchen längst bekannt, auch für den Menschen von *Eppinger* und *Schiller* (l. c.) gezeigt ist.

Wie aus Tabelle III hervorgeht, gilt dasselbe auch für das Kapillarblut des Fingers. Als Arbeit bei gesunden Personen wählten wir meist Treppenlaufen, wobei eine erschöpfende Arbeit von etwa 65 kg × 20 m = 1300 kg in 60 Sekunden geleistet wurde, wobei es auch zu starker Dyspnoe kam. Das Kapillarblut blieb dabei in 18 Fällen, innerhalb der Fehlergrenzen der Methode, konstant gesättigt, ja sogar zeigte sich in mehreren Fällen (Nr. 7, 11, 16, 26) eine deutliche Überkompensation, so daß das Kapillarblut noch arterieller wurde als vorher. Bei normalen Versuchspersonen funktioniert also Atmungs- und Zirkulationsapparat mit dem vasomotorischen Nervensystem in derartiger Harmonie, daß es zu keiner Sauerstoffarmut der Gewebe kommt.

Tabelle IV.

Arbeitsversuche an Herzkranken.

Nr.	Name	Partielle O_2-Sättigung vorher Proz.	nachher Proz.	Differenz Proz.	Bemerkungen
34	*R.*	92,0	83,4	— 6,6	Vitium. Geringe Dekompensation. Aufsitzen im Bett. Dyspnoe
37	*Mué.* . . .	91,4	92,7	+ 1,3	Kompensiertes Vitium. Aufsitzen im Bett Ermüdung. Geringe Arbeitsdyspnoe
38	*Fei.*	86,9	93,6	+ 6,7	Kompensiertes Vitium. Kniebeuge. Überkompensation.
39	*Kué.* . . .	86,9	86,3	— 0,3	Kompensiertes Vitium. Aufsitzen im Bett. Ermüdung
40	*Fö.*	83,4	80,0	— 3,4	Myodegeneratio. Aufsitzen im Bett
41	*N.*	82,9	80,7	— 2,2	Aorta vitium. Hypostase. Aufsitzen im Bett. Ermüdung

Bei sechs Fällen von Vitium wurde dreimal bei Nr. 37, 38, 39, in welchen das Vitium gut kompensiert war, dasselbe beobachtet, wie bei normalen Menschen, nämlich nach ermüdender Arbeit keine Abnahme des O_2-Gehaltes im Kapillarblut. Dagegen haben wir in drei anderen Fällen (Nr. 34, 40, 41) eine allerdings nur sehr geringe Abnahme des O_2-Gehaltes im Kapillarblut

gesehen, von 2,2, 3,4 bzw. 6,6 Proz. [Dazu wäre zu bemerken, daß einmal auch bei einer normalen Person nach Treppenlaufen eine Abnahme von 2,5 Proz. (Nr. 9) gesehen wurde.] Eine endgültige Entscheidung über den Einfluß der Arbeit sowie der Besprechung der klinischen Bedeutung dieser Zahlen behalten wir uns weiteren Mitteilungen vor.

Zusammenfassung.

Aus diesen Untersuchungen geht hervor, daß der Gasgehalt des Kapillarblutes der Fingerbeere nahezu als arteriell betrachtet werden kann, und seine Untersuchung deshalb ähnliche Aufklärungen gibt wie die des arteriellen Blutes. Mittels der angegebenen, höchst einfachen Methodik läßt sich diese Untersuchung leicht an jedem Kranken ausführen. Bei Normalen ist die O_2-Sättigung etwa 91 Proz., fast nie unter 85 Proz., und nie unter 82 Proz. Bei kompensiertem Vitium wurden normale Werte gefunden. Bei Lungenaffektionen und auch bei dekompensiertem Vitium mit Lungenaffektion vermindert sich die O_2-Sättigung sehr wesentlich. Bei Muskelarbeit ändert sich ebenso wie im arteriellen Blute auch im Kapillarblute die O_2-Sättigung bei normalen Personen nicht. Die Arbeitsversuche an pathologischen Fällen werden fortgesetzt.

Literatur.

1) *Hürter*, Deutsch. Arch. f. klin. Med. **108**, 1, 1912. — 2) *G. Harrop*, Journ. of exper. Med. **30**, 241, 1919; nach Zentralbl. f. biochem. Biophys. **28**, 134. — 3) *Stadie*, Journ. of exper. Med. **30**, 215, 1919; nach Zentralbl. f. biochem. Biophys. **28**, 135; Proc. Soc. exper. Med. **16**, 88, 1919, New York; Zentralbl. f. biochem. Biophys. **28**, 133. — 4) *Lundsgaard*, Journ. of exper. Med. **30**, 259, 271, 1919; nach Zentralbl. f. biochem. Biophys. **28**, 134. — 5) *Eppinger* und *Schiller*, II. Wien. Arch. f. inn. Med., S. 581, 1921. — 6) *Barcroft*, persönliche Mitteilung. — 7) *Högler*, Über Arterienpunktion, Wien. Arch. f. inn. Med. **2**, 631, 1921. — 8) *Kauders* und *Porges*, Klin. Wochenschr. **2**, 247, 1923. — 9) *Verzár* und *Gara*, Pflügers Arch. **188**, 235, 1920. — 10) *Verzár* und *Keller*, Internistenkongreß in Wien, April 1923.

Über Isohämagglutination und Blutkörperchensenkung.

Von

L. Richter.

(Aus dem Institut für allgemeine Pathologie der Universität in Debreczen.)

(Eingegangen am 29. Juni 1923.)

Mit 1 Abbildung im Text.

Bekanntlich lassen sich unter den Menschen vier Gruppen unterscheiden, deren Sera gegenseitig ihre Blutkörperchen agglutinieren. Die diesbezüglichen Kenntnisse sind in Arbeiten von *Weszeczky*[1]) und von *Verzár*[2]) kritisch bearbeitet, wo auch die ältere Literatur angeführt ist. In neueren Versuchen von *L.* und *P. Hirschfeld*, sowie von *Verzár* und *Weszeczky*[3]) wurde nachgewiesen, daß die Ursache dieser Differenzen in Rassenunterschieden zu suchen ist. Nachdem sich die Frage derzeit erfolgreich in dieser Richtung entwickelt, soll hier ein Punkt besprochen werden, der zu einem Mißverständnis in verschiedenen Arbeiten geführt hat. Dieses besteht darin, daß die Erscheinungen der Isohämagglutination mit der Stabilitätsreaktion von *Fahraeus* bzw. der Untersuchung der Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit in Zusammenhang gebracht wurden.

Vielleicht entstand dieses Mißverständnis zuerst auf sprachlichem Gebiete, als man von Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit sprechend, wiederholt den Ausdruck Agglutination lesen konnte[4]). Doch hat sich dann leider auch eine sachliche Verwechslung gezeigt, indem die wichtigen Befunde von *Fahraeus* und der Schule von *Höber* zur Erklärung der Stabilitätsreaktion des Blutes auf die Isohämagglutination angewendet wurden.

Eden[5]) hat behauptet, daß unter dem Einfluß von Medikamenten, Narkose und Röntgenbestrahlung die Isohämagglutinationsgruppe sich ändert. *Freund*[6]) schreibt: ,,Vor kurzem hat *Eden* gezeigt, daß die Gruppen-

[1]) *Weszeczky*, diese Zeitschr. **107**, 159, 1920.

[2]) *Verzár*, Klin. Wochenschr. 1922.

[3]) *Verzár* und *Weszeczky*, diese Zeitschr. **126**, 33, 1921.

[4]) Siehe z. B. *Vey*, Deutsch. med. Wochenschr. **49**, 537; *Caspari*, *Eliasberg* und *Fiegel*, Klin. Wochenschr., Jahrg. 2, Nr. 9, S. 390, 1923; *Linzenmeyer*, Pflügers Arch. **181**, 175, 1920.

[5]) *Eden*, Deutsch. med. Wochenschr. **48**, 3, 85, 1922.

[6]) *Freund*, Die theoretischen Grundlagen der Bluttransfusion, Klin. Wochenschr. **1**, 1219, 1922.

zugehörigkeit hinsichtlich der Agglutinierbarkeit keine bleibende Eigenschaft der Erythrocyten ist, sondern bei verschiedenen Krankheiten unter der Wirkung mancher Medikamente u. a. m. einem Wechsel unterliegt. Das ist um so verständlicher, als das Agglutinationsvermögen sicher nahe Beziehungen hat zu der heute so vielfach untersuchten Suspensionsstabilität. Der positive Ausfall des Agglutinationsversuches ist also möglicherweise nur der Indikator für eine physikalische Veränderung des Serums.“ Das widerspricht der schon von *Landsteiner*[1]) 1909 hervorgehobenen Tatsache, daß die Agglutinationsgruppe im Laufe des Lebens sich nicht ändert, wie das übrigens aus den zahlreichen inzwischen erschienen Arbeiten wiederholt hervorgegangen ist, so daß sie selbst zu forensischen Zwecken verwendet wird. *Mino*[2]) widerlegt direkt die Versuche von *Eden*, indem er in zahlreichen Fällen beweist, daß die Isohämagglutinationsgruppe auch unter den von *Eden* gewählten Verhältnissen vollständig konstant bleibt. *Vorschütz*[3]) äußert sich zu diesen Versuchen von *Eden* und behauptet noch, daß auch verschiedene Krankheiten einen Einfluß auf die Blutgruppe haben könnten, wogegen auch schon vor Jahren *Landsteiner* (l. c., S. 413) nachgewiesen hat, daß die Isohämagglutination nichts mit bestimmten Krankheitsprozessen zu tun hat. *Vorschütz* untersucht überhaupt keine Isohämagglutinationsgruppe, sondern nur Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit, und stellt trotzdem neben den bekannten vier noch eine fünfte Agglutinationsgruppe auf. In einer zweiten Arbeit[4]) erklärt er die Isohämagglutinationsgruppen auf Grund von Resultaten, die er von Senkungsgeschwindigkeit bekommen hat, und deshalb ist auch seine Behauptung unbegründet, daß er bewiesen habe, daß die Gruppenagglutinationsphänomene auf einer verschiedenen Ladung der Menschenblutkörperchen beruhen. Soweit ich sehen kann, hat er überhaupt keine Versuche mit Isohämagglutination, sondern immer nur mit Senkungsgeschwindigkeit gemacht, was auch *P. Mino* schon aufgefallen ist[5]). Wenn er behauptet, die Ursache der Isohämagglutinationsgruppen sei ein verschiedener Gehalt an Nucleoproteiden, so hätte er das erst tun dürfen, wenn er auch die Gruppen bestimmt hätte. Verschiedene Menschenrassen braucht man dazu, wie von ihm angegeben wird, ja gar nicht, um alle vier Gruppen zu finden. Aus den Arbeiten von *Vorschütz* können also Schlüsse auf die Senkungsgeschwindigkeit der Blutkörperchen abgeleitet werden, nicht aber auf die Ursache der Isohämagglutinationsgruppen.

Isohämagglutionation und Senkungsgeschwindigkeit sind zwei voneinander vollständig unabhängige Eigenschaften des Blutes. Hierfür spricht auf Grund unserer bisherigen Kenntnisse das Folgende:

1. Die Isohämagglutinationsgruppe bleibt während des ganzen Lebens konstant, die Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit nimmt zu im Fieber, in der Gravidität usw.

---

[1]) *Landsteiner*, Oppenheimers Handb. d. Biochem., Hämagglutination und Hämolyse II, 1, 414, Anmerkung.

[2]) *Prospero Mino*, Riforma Medica, anno XXXIX, Nr. 4, 1923.

[3]) *Vorschütz*, Zeitschr. f. klin. Med. **94**, 459.

[4]) *Derselbe*, „Worauf beruht das Wesen der einfachen wie der Gruppenhämagglutination“, Zeitschr. f. klin. Med. **96**, H. 4—6, 1923.

[5]) *P. Mino*, l. c.

2. Die Isohämagglutinationsgruppe des Serums wird durch Inaktivierung nicht beeinflußt[1]); demgegenüber hört die Änderung der Senkungsgeschwindigkeit auf[2]).

3. Die Isohämagglutinationsgruppe bleibt nach eigenen Versuchen nach Defibrinieren dieselbe, die Senkungsbeschleunigung ändert sich[3]).

Zu diesen Beweisen kann ich noch auf Grund der folgenden Untersuchungen hinzufügen:

4. In jeder Isohämagglutinationsgruppe kann man Senkungsgeschwindigkeit jeder Art beobachten.

5. Injektionen, Röntgenstrahlen usw. beeinflussen zwar die Senkungsgeschwindigkeit, nicht aber die Isohämagglutinationsgruppe.

Nr.	Patient	Diagnose	Vorher		Nachher		Bemerkungen
			S. R.	I. G.	S. R.	I. G.	
1	*M. I.*	Lues	19	III.	32	III.	Therapeutischer Injektion a. d. Universitäts-Hautklinik
2	*S. I.*	Pyoderma	45	III.	59	III.	Dasselbe
3	*K. G.*	Cystitis	26	II.	48	II.	"
4	*F. I.*	Ulcus cruris	38	IV.	43	IV.	"
5	*V. P.*	Gumma	27	I.	40	I.	"
6	*N. A.*	Lues tert.	18	IV.	56	IV.	"
7	*S. I.*	Lues tert.	12	II.	37	II.	"
8	*Cs. S.*	Lupus Erythema	8	I.	40	I.	Später wieder S. R. 6, I. Gr. I.
9	*O. A.*	Lues	14	III.	7	III.	Therapeutischer Injektion
10	*T. I.*	Ophthalm. cath. ac.	18	I.	34	I.	" "
11	*H. J.*	Ophthalm. cath. ac.	29	I.	36	I.	" "
12	*N. S.*	Gonorrhoea	10	II.	25	II.	" "
13	*V. I.*	Carc.	68	IV.	5	IV.	Narkose
14	*H. D.*	Exud. param. resid.	6	IV.	5	IV.	
15	*T. L.*	Tumor abd.	35	III.	30	III.	Narkose
16	*M. S.*	Exsud. param.	9	IV.	13	IV.	
17	*V. L.*	Myoma uteri	5	III.	14	III.	Später wieder S. R. 6, I. G III
18	*T. T.*	Cholecysta tumor	5	II.	5	II.	Röntgenbestrahlung
19	*Cz. I.*	Folikulitis suppurativa	25	III.	17	III.	"

S. R. = Stabilitätsreaktion, Senkung in Millimetern nach einer Stunde.
I. G. = Isohämagglutinationsgruppe.

Nachdem die Feststellung der Isohämagglutinationsgruppe und besonders die Frage, ob sie während des ganzen Lebens konstant ist, die Grundlage für alle weiteren therapeutischen, forensischen und rassenbiologischen Untersuchungen über Isohämagglutination ist, so habe ich untersucht, ob ein Zusammenhang zwischen Senkungsgeschwindigkeit und Hämagglutination nachzuweisen ist. Die Senkungsgeschwindigkeit wurde in 150 mm hoher Sicht nach 1, 3 und 24 Stunden

[1]) Siehe *Moss*, Folia Serologica 1910, S. 267; *Weszeczky*, diese Zeitschr. **107**, 163, 1920.

[2]) *Linzenmeyer*, Pflügers Arch. **181**, 176, 1920.

[3]) *Derselbe*, ebendaselbst **181**, 177, 1920.

abgelesen. Die Hämagglutination wurde in kleinen Reagenzröhrchen[1]) aufgestellt, wobei je 2 Tropfen Testserum und 1 Tropfen Blutkörperchen in Verdünnung 1 : 10 benutzt wurde, und nach 2 Stunden abgelesen.

In der einen Versuchsreihe wurde geprüft, ob die Isohämagglutinationsgruppen sich nach verschiedenen therapeutischen Eingriffen ändern, insbesondere auch dann, wenn die Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit sich änderte. Es wurde deshalb bei 19 Patienten verschiedenster Art die Senkungsgeschwindigkeit vor und nach einem Eingriff bestimmt und gleichzeitig auch die Isohämagglutination festgestellt. Die Resultate sind in der vorstehenden Tabelle zusammengefaßt. Es zeigte sich, daß die Isohämagglutinationsgruppe nach Injektionen

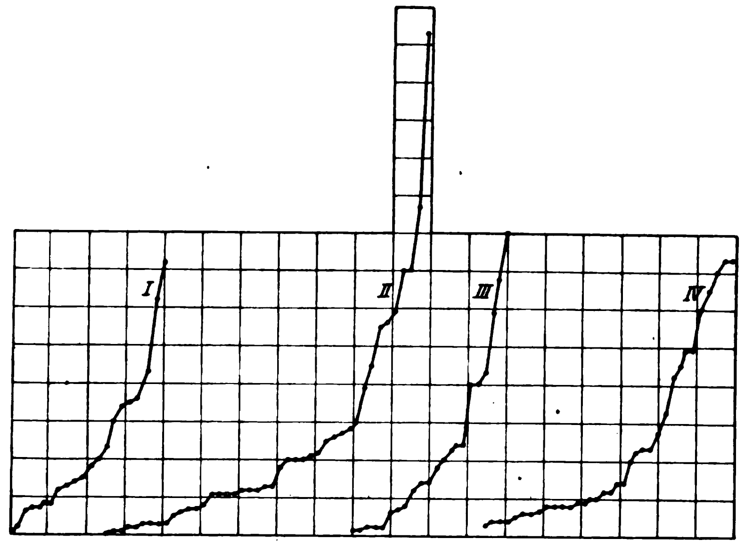


Abb. 1. Senkungsgeschwindigkeit der ersten Stunde in Millimetern. Die Zahlen bedeuten die Isohämagglutinationsgruppe.

(Milch usw.), Röntgenbestrahlung, Narkose niemals sich änderte, selbst dann nicht, wenn die Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit sich sehr wesentlich verändert hatte (z. B. im Falle 3, 6, 8, 13). Bezüglich der Isohämagglutination widerspricht also dieses Resultat jenem von *Eden* und bestätigt das von *Mino*. Es geht aus dieser Versuchsreihe schon mit Wahrscheinlichkeit hervor, daß zwischen der Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit und der Isohämagglutinationsgruppe keine Zusammenhänge bestehen. Die Lehre, daß die Isohämagglutinationsgruppe sich im Laufe des Lebens nicht ändert, bleibt also auch weiterhin unerschüttert.

---

[1]) *S. Weszeczky*, diese Zeitschr. **107**, 162, 1920.

In der zweiten Versuchsreihe wurde untersucht, ob im allgemeinen ein Zusammenhang zwischen Senkungsgeschwindigkeit und Isohämagglutinationsgruppe besteht. In 123 Fällen wurde an Blut von Gesunden und Kranken sowohl die Blutgruppe als auch die Senkungsgeschwindigkeit bestimmt.

Die Resultate sind in Kurvenformen zusammengestellt. Die Senkungsgeschwindigkeit nach einer Stunde ist in Millimetern wiedergegeben. Alle Blute, die zu einer gewissen Isohämagglutinationsgruppe gehören, sind nebeneinander gestellt und in einer Kurve verbunden. Es ist aus diesen Kurven klar, daß in jeder Isohämagglutinationsgruppe jede Größe von Senkungsgeschwindigkeit vorkommt, und daß nicht der geringste Anhaltspunkt vorhanden ist, daß ein Zusammenhang zwischen Isohämagglutination und Senkungsgeschwindigkeit vorhanden ist. Die Senkungsgeschwindigkeit kann innerhalb jeder Blutgruppe groß oder gering sein, irgend ein Zusammenhang zwischen der Größe dieser mit der Gruppe ist nicht vorhanden.

Zusammenfassung.

Einerseits auf Grund der bisher bekannten Tatsachen, andererseits dieser experimentellen Befunde ist es zweifellos, daß Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit und Isohämagglutination zwei voneinander unabhängige Erscheinungen sind.

Es wurde gezeigt, daß in jeder Isohämagglutinationsgruppe jegliche Größe von Senkungsgeschwindigkeiten vorkommt und daß medikamentöse Beeinflussung die Blutgruppe unbeeinflußt läßt, während die Senkungsgeschwindigkeit sich ändert.

Man kann also aus Untersuchungen über die Beeinflussung der Senkungsgeschwindigkeit nichts bezüglich jener physiko-chemischen Ursachen folgern, die die Grundlage der Isohämagglutinationsgruppenbildung sind.

Die Arbeit ist auf Anregung und unter Leitung von Herrn Prof. *F. Verzár* ausgeführt.

Adsorption von Eiweißabbauprodukten durch die Formelemente des Blutes in vivo und in vitro.

II. Mitteilung[1]).

Die Adsorption durch die roten Blutkörperchen.

Von

B. Sbarsky.

(Aus dem biochemischen Institut des Kommissariats für Volksgesundheit in Moskau.)

(Eingegangen am 25. Juni 1923.)

In der ersten Mitteilung[1]) wurde bewiesen, daß Eiweißabbauprodukte (Erepton, Diphtherietoxin), dem Kaninchen intravenös eingeführt, in dem sofort entnommenen Blute nicht zu entdecken sind. Dieses Verschwinden der Abbauprodukte aus dem Blutkreislaufe ist aber nur ein scheinbares, da sie nach dem Kochen des Blutes quantitativ wieder zu finden sind. Dieselbe Erscheinung tritt auch *in vitro* ein, wenn dem Blute Diphtherietoxin zugegeben wird. Da dem Serum diese Eigenschaft, einer Lösung Eiweißabbauprodukte zu entziehen, nicht zukommt, so konnte man schließen, daß für diese Erscheinung die Formelemente des Blutes verantwortlich sind.

Um festzustellen, welchen Elementen des Blutes die Adsorptionsfähigkeit zukommt, wurden weitere Untersuchungen (in vivo und in vitro) mit roten Blutkörperchen angestellt.

Versuche in vitro. Für diese Versuche wurden die roten Blutkörperchen durch Zentrifugieren von defibriniertem Kaninchenblut und mehrmaliges Waschen mit physiologischer Kochsalzlösung erhalten. Dann wurde zu je 3 ccm einer Emulsion von Blutkörperchen in Kochsalzlösung (5 ccm Blutkörperchen in 25 ccm Kochsalzlösung) Diphtherietoxin (1 ccm) zugesetzt; die Mischung im Brutschrank eine halbe Stunde aufbewahrt und nach der Adsorption die Abbauprodukte bestimmt.

Tabelle I.

mg N_2O_3			Adsorption
Kontrollversuch	Hauptversuch		
	ungekochtes Blut	gekochtes Blut	Proz.
0,0146	0,0046	0,0152	68,5
0,0153	0,0045	0,0158	70,6
0,0140	0,0042	0,0147	70,0
0,0200	0,0060	0,0210	70,0
0,0180	0,0057	0,0200	68,4

[1]) I. Mitteilung, diese Zeitschr. **135**, 21, 1923.

Aus diesen Zahlen ergibt sich, *daß das Blut seine Adsorptionsfähigkeit den roten Blutkörperchen verdankt.*

Versuche in vivo. Kaninchen wurden intravenös je 10 ccm Diphtherietoxin beigebracht, worauf sie sofort entblutet wurden. Das Blut der Versuchstiere wurde defibriniert und zentrifugiert. Die isolierten Blutkörperchen wurden im nativen und gekochten Zustande gleichzeitig auf ihren Gehalt an Eiweißabbauprodukten untersucht. Zur Kontrolle benutzten wir ungekochte und gekochte rote Blutkörperchen normaler Kaninchen. Es sei hier erwähnt, daß die Menge der in den gekochten Proben gefundenen Eiweißabbauprodukte von der Dauer des Erhitzens abhängig ist. Um Fehler in dieser Hinsicht zu vermeiden, hielten wir es für nötig, in allen unseren Versuchen das Sieden in bestimmter Weise durchzuführen; das Blut wurde in (etwa 2 cm) breiten Probierröhrchen unter beständigem Umschütteln 1 Minute im siedenden Wasserbade gehalten.

Tabelle II.

Blutkörperchenmenge ccm	Physiologische Kochsalzlösung ccm	mg N_2O_3 Hauptversuch ungekochtes Blut	mg N_2O_3 Hauptversuch gekochtes Blut	mg N_2O_3 Kontrollversuch normaler Kaninchen
3	5	Spuren	0,0057	0,0022
3	6	„	0,0050	0,0016
5	8	0,0010	0,0090	0,0028
5	10	0,0008	0,0093	0,0031

Wie zu ersehen ist, geben die Erythrocyten vor dem Aufkochen nur spurenweise die von ihnen adsorbierten Eiweißabbauprodukte an physiologische Kochsalzlösung ab; nach dem Aufkochen konnte dagegen eine bedeutende Menge dieser Produkte in der Lösung aufgefunden werden. Erythrocyten normaler Tiere liefern dagegen beim Erhitzen bedeutend weniger Eiweißabbauprodukte.

Aus den obigen Versuchen geht mit voller Deutlichkeit hervor, daß die Fähigkeit, Eiweißabbauprodukte zu adsorbieren, sowohl in vivo als in vitro den roten Blutkörperchen eigen ist.

Einfluß der Aufbewahrungszeit von Blutkörperchen auf ihre Adsorptionsfähigkeit.

15 ccm mehrmals gewaschener roter Blutkörperchen wurden in 75 ccm physiologischer Kochsalzlösung suspendiert und im Eisschrank aufbewahrt. Für jeden Versuch wurden nach bestimmter Zeit je 3 ccm dieser vorher durchgeschüttelten Emulsion entnommen, mit 1 ccm Diphtherietoxin versetzt, eine halbe Stunde im Brutschrank gehalten, dann wurden die nicht adsorbierten Abbauprodukte bestimmt. Im Kontrollversuch wurde das Blut durch physiologische Kochsalzlösung ersetzt.

Tabelle III.

Adsorption in Prozenten nach Stunden				
0	24	48	72	120
70,4	63,5	52,0	38,3	21,0
68,0	52,3	40,0	35,2	20,0
71,0	55,6	39,0	30,0	18,0

Die Adsorption sinkt deutlich mit der Dauer der Aufbewahrung, behält jedoch diese Eigenschaft noch nach 5 Tagen, wenn auch in geringerem Maße, bei.

Einfluß der Konzentration des Toxins auf die Adsorption.

Je 0,5 ccm roter Blutkörperchen wurden in 2,5 ccm physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmt, mit steigender Menge Toxin behandelt und mit Kochsalzlösung auf 4 ccm aufgefüllt. Als Kontrolle dienten gleiche Toxinmengen in Kochsalzlösung ohne Zusatz von Blutkörperchen. Für jede Konzentration wurden also je ein Hauptversuch und ein Kontrollversuch angestellt. Diese Anordnung ist deswegen notwendig, weil die angewandte Bestimmungsmethode nur bei niederen Konzentrationen der Abbauprodukte genau quantitative Resultate liefert. Oberhalb gewisser Grenzen ist die Menge der erhaltenen Nitrite der Menge der Abbauprodukte nicht mehr proportional. Dies ist aus dem folgenden Beispiel ersichtlich.

Tabelle IV.

Toxinmenge ccm	Physiol. NaCl ccm	mg N_2O_3	Toxinmenge ccm	Physiol. NaCl ccm	mg N_2O_3
0,1	1,4	0,0010	0,8	0,7	0,0102
0,2	1,3	0,0021	0,9	0,6	0,0120
0,3	1,2	0,0032	1,0	0,5	0,0147
0,4	1,1	0,0041	1,1	0,4	0,0160
0,5	1,0	0,0053	1,2	0,3	0,0180
0,6	0,9	0,0067	1,5	0,0	0,0210
0,7	0,8	0,0089			

Nach einem halbstündigen Verbleiben der Proben im Brutschrank wurden die Abbauprodukte in der üblichen Weise bestimmt.

Die Resultate finden sich in der Tabelle V.

Für die Fälle einfacher, sogenannter mechanischer Adsorption kann man die Beziehung zwischen der Konzentration des gelösten Körpers und der adsorbierten Menge desselben meistens durch die Formel $X = K\,(C - X)^n$ ausdrücken.

Ein Blick auf die Zahlen der unten angeführten Tabelle zeigt, daß in unserem Falle diese Formel vollständig versagt. Es ist darin nichts Überraschendes, denn die Formel von *Freundlich* ist ja bekanntlich

Tabelle V.

Blutkörperchen ccm	Physiol. Kochsalzlösung ccm	Toxinmenge ccm	mg N_2 1 Hauptversuch	mg N_2 1 Kontrollversuch	mg N_2 2 Hauptversuch	mg N_2 2 Kontrollversuch	Adsorption 1 Proz.	Adsorption 2 Proz.
0,5	2,50	1,00	0,0076	0,0367	0,0093	0,0247	71	69
0,5	2,70	0,80	—	—	0,0082	0,0185	—	56
0,5	2,75	0,75	0,0046	0,0092	0,0060	0,0128	50	54
0,5	2,90	0,60	—	—	0,0053	0,0105	—	50
0,5	3,00	0,50	0,0032	0,0041	0,0034	0,0049	22	30
0,5	3,10	0,40	—	—	0,0028	0,0032	—	13
0,5	3,25	0,25	0,0023	0,0022	0,0025	0,0021	0	0
0,5	3,30	0,20	—	—	0,0017	0,0015	—	0

für solche völlig reversible Adsorptionsprozesse angegeben, wie z. B. für die Adsorption von Essigsäure an Kohle usw.; die Versuche von *Michaelis* haben gezeigt, daß, wenn wir bei demselben Adsorbens, z. B. Kohle, Körper von komplexerer Natur, wie Proteine, Albumosen usw., nehmen, die gewöhnliche Adsorptionsformel nicht mehr gültig ist. Nun wird in unserem Falle die ganze Erscheinung noch dadurch wesentlich verwickelter, daß anstatt eines verhältnismäßig einfachen Adsorbens, wie z. B. Kohle, wir es mit einem in kolloidchemischer Hinsicht so komplizierten Körper zu tun haben, wie dies die Erythrocyten sind.

Zusammenfassung.

1. Der in der ersten Mitteilung gemachte Befund, daß die Eiweißabbauprodukte durch die Formelemente des Blutes adsorbiert werden, wird weiter durch direkte Versuche mit isolierten Erythrocyten in vitro bzw. in vivo völlig bestätigt.

2. Die Adsorptionsfähigkeit der Erythrocyten sinkt allmählich beim Aufbewahren derselben ab, geht aber noch nach 5 Tagen nicht ganz verloren.

3. Die Menge der adsorbierten Abbauprodukte hängt bei gleicher Erythrocytenmenge von der Konzentration der ersteren ab. Die Beziehung zwischen der Konzentration und der adsorbierten Menge läßt sich nicht durch die von *Freundlich* aufgestellte, einfache Adsorptionsformel ausdrücken. Die Abweichung ist wahrscheinlich dadurch bedingt, daß sowohl das Adsorbendum — die Eiweißabbauprodukte — als auch das Adsorbens — die Erythrocyten — Körper von recht komplizierter Natur sind.

Adsorption von Eiweißabbauprodukten durch die Formelemente des Blutes in vivo und in vitro.

III. Mitteilung[1]).

Adsorptionsfähigkeit des Blutes verschiedener Tiere.

Von

B. Sbarsky und **D. Michlin.**

(Aus dem biochemischen Institut des Kommissariats für Volksgesundheit in Moskau und der biochemischen Abteilung des Staatsinstituts für experimentelle Veterinärkunde.)

(Eingegangen am 25. Juni 1923.)

Bezugnehmend auf die Tatsache, daß Toxine unzweifelhaft Abbauprodukte der Proteinstoffe sind, und daß den Formelementen des Blutes die Fähigkeit zukommt, Proteinabbauprodukte zu binden, wurde in der ersten Mitteilung die Vermutung ausgesprochen, daß *der erste Akt der Immunisation die Adsorption der Toxine durch die Blutkörperchen sei.*

Um weitere Aufschlüsse über diesen Gegenstand zu gewinnen, suchten wir festzustellen, ob zwischen der Empfindlichkeit verschiedener Tierarten einem bestimmten Toxin gegenüber und der Fähigkeit ihres Blutes, aus demselben Proteinabbauprodukte zu adsorbieren, ein Zusammenhang besteht. Als Toxin wählten wir das Diphtherietoxin, als Versuchstiere: Ratten, Kaninchen, Meerschweinchen, Pferde, Hühner und Tauben, da in der Literatur zahlreiche Angaben über die Empfindlichkeit dieser Tierarten gegenüber dem Diphtherietoxin zu finden sind.

Die Versuche wurden in folgender Weise durchgeführt. Das aus der Vene (bei Ratten direkt aus dem Herzen) entnommene Blut wurde mit der gleichen Menge 0,4proz. Ammoniumoxalatlösung vermischt. Zu je 6 ccm Oxalatblut wurden 2 ccm Toxin gegeben, das Gemisch wurde eine halbe Stunde stehengelassen und in zwei gleiche Portionen zu je 4 ccm geteilt. In einer Probe wurde die Adsorptionsverbindung zwischen Toxin und Blutkörperchen durch eine Minute langes Erhitzen in siedendem Wasser zerstört (vgl. die vorigen Mitteilungen). In den Kontrollversuchen wurde das Blut durch Wasser ersetzt.

---

[1]) I. und II. Mitteilung, diese Zeitschr. **135**, 21; **141**, 33, 1923.

Zahlreiche Versuche wurden in dieser Weise ausgeführt. Als Beispiel seien hier folgende Resultate angegeben.

Durch das Blut verschiedener Tiere adsorbierte Abbauprodukte.

Tierart	mg N_2O_3			Adsorption Proz.	mg N_2O_3			Adsorption Proz.
	ungekochtes Blut	gekochtes Blut	Kontrolle		ungekochtes Blut	gekochtes Blut	Kontrolle	
Ratte	0,0274	0,0340	0,0310	12,0	0,0272	0,0360	0,0320	15,0
Kaninchen	0,0082	0,0402	0,0334	75,5	0,0082	0,0372	0,0341	76,0
Pferd	0,0038	0,0312	0,0306	87,6	0,0046	0,0428	0,0416	89,0
Meerschweinchen	0,0034	0,0357	0,0336	90,0	0,0018	0,0341	0,0205	92,2
Huhn	0,0030	0,0402	0,0324	91,0	0,0025	0,0394	0,0356	92,7
Taube	0,0020	0,0362	0,0318	94,0	0,0009	0,0412	0,0382	97,6

Wie aus obiger Tabelle ersichtlich ist, verhält sich das *gekochte* Blut verschiedener Tierarten in ganz gleicher Weise derart, daß in keinem Falle Adsorption eintritt. Das *ungekochte* Blut liefert dagegen Adsorptionszahlen, die für jede Tierart charakteristisch sind. Es zeigte sich in vielen Versuchen, daß bei einer und derselben Tierart die Größe der Adsorptionsfähigkeit in sehr engen Grenzen (von 2 bis 3 Proz.) schwankt. Dieser Befund ermöglicht es, nach der Adsorptionsgröße des Blutes seine Herkunft vorauszusagen.

Die Mittelzahlen der Adsorptionsfähigkeit des Blutes der untersuchten Tiere lassen sich in folgende Reihe ordnen:

Ratte	Kaninchen	Pferd	Meerschweinchen	Huhn	Taube
14 Proz.	75,8 Proz.	88 Proz.	91,8 Proz.	93 Proz.	95 Proz.

Über Empfindlichkeit verschiedener Tiere gegen Diphtherie finden sich in der Literatur folgende Angaben vor.

Roux und *Jersin*[1]) ordneten zuerst verschiedene Tierarten in eine Reihe ihrer Empfindlichkeit gegen Diphtherietoxin. Die geringste Empfindlichkeit fanden diese Autoren bei Ratten, eine größere bei Kaninchen, Meerschweinchen und die größte bei Tauben. *Escherich*[2]), der mit Diphtheriebouillon experimentierte, fand bei Meerschweinchen eine größere Empfindlichkeit als bei Kaninchen. *Morax* und *Elmassion*[3]) bestätigen die hier angeführten Resultate und zeigten, daß auf 100 g Körpergewicht die letale Dosis für Kaninchen — 0,005 ccm, für Meerschweinchen — 0,002 ccm betrug. *Behring*[4]) bestätigt die auf Ratten und Tauben bezüglichen Angaben, fand aber bei Kaninchen und Meerschweinchen widersprechende Resultate: die Kaninchen schienen empfindlicher als Meerschweinchen. Zu gleicher Zeit machte *Behring* darauf aufmerksam, daß bei der Frage der Empfindlich-

[1]) Ann. de l'Inst. Pasteur 1888.
[2]) Ebendaselbst 1898.
[3]) Zeitschr. f. Hyg. 7, 1890.
[4]) Allgem. Therapie d. Infektionskrankh. 1898.

keit die Rasse der Tiere nicht ohne Belang ist. So unterscheiden sich die deutschen und englischen Meerschweinchen ganz merklich in ihrer Empfindlichkeit gegen dieselben Toxindosen.

Die sich hier teilweise widersprechenden Resultate sind sicher auch der Bestimmungsmethode und der Unmöglichkeit, die Toxine genau zu dosieren, zuzuschreiben. Die biologischen Bestimmungsmethoden basieren auf den Temperatur- und Gewichtsschwankungen des untersuchten Tieres oder auf dem Zeitintervall zwischen der Toxineinführung und dem Tode, was individuellen Schwankungen unterliegt, und worauf schon *Behring* aufmerksam gemacht hat. Jedenfalls ist es zweifellos, daß die Ratten und Tauben die zwei entgegengesetzten Endglieder dieser Reihe bilden. Wir konnten diese methodischen Bestimmungsfehler vermeiden, da wir bei der Mischung des Blutes mit dem Toxin in vitro die Adsorption auf rein chemischem Wege bestimmten. In unseren Versuchen kompensieren sich die individuellen Schwankungen gegenseitig, da die oben angeführten Zahlen Mittelwerte vieler Beobachtungen darstellen. Die von uns beobachtete Reihe ist fast identisch mit derjenigen, welche früher von verschiedenen Immunitätsforschern aufgestellt worden ist. Diese Übereinstimmung ist so überraschend, daß sie gewissermaßen die Hypothese des einen von uns [*Sbarsky*[1])] über den Zusammenhang zwischen Empfindlichkeit der Tiere gegen die Toxine und der Adsorption seiner roten Blutkörperchen unterstützt.

Zusammenfassung.

1. Es erwies sich, daß die Adsorptionsfähigkeit des Blutes gegenüber Eiweißabbauprodukten bei verschiedenen Tierarten in weiten Grenzen variiert.

2. Auf Grund vieler Versuche wurde festgestellt, daß die Adsorptionsgröße des Blutes gegenüber den Eiweißabbauprodukten des Diphtherietoxins für jede Tierart einen charakteristischen Wert darstellt.

3. Ordnet man die untersuchten Tiere nach zunehmender Adsorptionsfähigkeit ihres Blutes gegenüber dem Diphtherietoxin, so erhält man folgende Reihe: *Ratte*, *Kaninchen*, *Pferd*, *Meerschweinchen*, *Huhn* und *Taube*. Diese Reihe stimmt fast vollständig mit derjenigen überein, die von verschiedenen Immunitätsforschern für die Empfindlichkeit derselben Tierarten gegen Diphtherietoxin aufgestellt worden ist.

4. Diese Übereinstimmung unterstützt die früher ausgesprochene Annahme, daß zwischen Adsorptionsfähigkeit und der Empfindlichkeit eines Tieres dem Toxin gegenüber ein gewisser Zusammenhang besteht.

---

[1]) Siehe I. Mitteilung, diese Zeitschr. **135**, 21, 1923.

Über die Abhängigkeit der Temperaturempfindlichkeit der Malzamylase von der Acidität.

Von

Efr. Ernström.

(Aus dem biochemischen Laboratorium der Universität Stockholm.)

(Eingegangen am 2. Juli 1923.)

Mit 1 Abbildung im Text.

Vor kurzer Zeit haben *Lüers* und *Lorinser*[1]) in dieser Zeitschrift eine Mitteilung über die Hitzeinaktivierung der Amylase in Abhängigkeit von der Wasserstoffionenkonzentration veröffentlicht.

Die genannten Verfasser erwähnen darin einleitend einige auf diesem Gebiete ausgeführten Untersuchungen; meine Arbeit „Über den Temperaturkoeffizienten der Stärkespaltung und die Thermostabilität der Malzamylase und des Ptyalins" scheint ihnen aber auffallenderweise entgangen zu sein[2]).

Meine Arbeit enthält unter anderem eine Untersuchung über die Abhängigkeit der Temperaturempfindlichkeit sowohl der Malzamylase als des Ptyalins von der Azidität. Bei den Untersuchungen wurde als Puffer teils Phosphatgemisch, teils Natrium- oder Calciumacetatgemisch verwendet. In allen untersuchten Fällen lag das Maximum der Thermostabilität innerhalb der Grenzen für maximale Wirkung ganz gemäß dem Ergebnis der Herren *Lüers* und *Lorinser.*

Lüers und *Lorinser* haben in ihren Untersuchungen Acetatgemisch als Puffer verwendet. Ich will darum hier kurz meine eigenen Versuche mit Natriumacetatgemisch als Puffer erwähnen.

In zugeschmolzenen Röhren wurden 8 ccm Malzamylaselösung (Trockensubstanz 0,63 mg per Kubikzentimeter) mit 10 ccm n/10 Natriumacetatlösung bei verschiedener Azidität (p_H = 4,01, 4,61, 5,06, 5,17, 5,87, 6,28, 6,62 und 6,75) 60 Minuten lang auf 55° C gehalten. Nach der Erhitzung wurde die Hälfte jeder Lösung zur Stärkever-

---

[1]) *Lüers* und *Lorinser*, diese Zeitschr. **138**, 487, 1922.

[2]) *Ernström*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **119**, 190, 1922. Meine Arbeit ist am 20. April 1922 erschienen; die dem Titel entsprechend das gleiche Thema behandelnde Mitteilung von *Lüers* und *Lorinser* ist der Redaktion am 2. August 1922 zugegangen.

zuckerung verwendet, welche bei optimalem p_H (5) bei 37° ausgeführt wurde. Reaktionsgemisch: 50 ccm 2proz. Stärkelösung, 20 ccm Puffergemisch, 4 ccm Enzymlösung und Wasser bis zusammen 100 ccm. Die andere Hälfte jeder erhitzten Lösung wurde zur Bestimmung von p_H verwendet. Der erhaltene Zucker wurde nach *Bertrand* als Maltose bestimmt und die Reaktionskonstante wurde nach der Formel $k = \frac{1}{t} \log \frac{a}{a - x}$ berechnet. a ist gleich 70 gesetzt, x gleich der während der Reaktion gebildeten Zuckermenge. Für die erhitzte Enzym-Acetatlösung mit $p_H = 5{,}17$ in der Reaktionsmischung ist die Reaktionsgeschwindigkeit mit 100 bezeichnet.

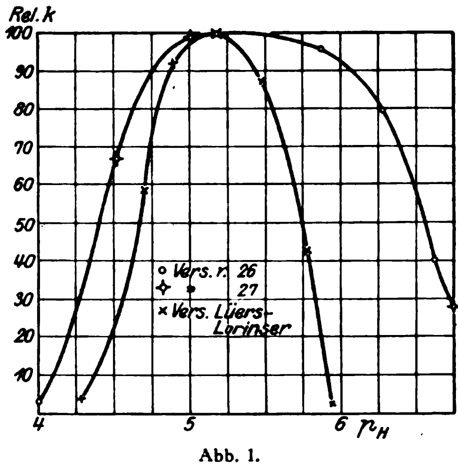


Abb. 1.

Die Zahlenresultate sind in folgender Tabelle zusammengestellt (vgl. meine Arbeit, l. c., S. 225, Versuch 26 und 27).

p_H	$k \cdot 10^3$	Relative Reaktionsgeschwindigkeiten	p_H	$k \cdot 10^3$	Relative Reaktionsgeschwindigkeiten
4,01	0,6	3,0	5,87	20,6	96,7
4,61	14,0	67,0	6,28	17,0	79,8
5,06	21,0	99,0	6,62	8,6	40,4
5,17	21,3	100,0	6,75	6,0	28,5

Aus der Tabelle geht hervor, daß bei den untersuchten Wasserstoffionenkonzentrationen die Stabilität am größten bei rund $p_H = 5{,}2$ ist. Wird das Resultat graphisch dargestellt, mit der relativen Reaktionsgeschwindigkeit als Funktion von p_H, so zeigt sich, daß ein Maximum der Stabilität bzw. ein Minimum der Empfindlichkeit bei etwa demselben p_H liegt, das auch *Lüers* und *Lorinser* fanden.

Der Grad der Übereinstimmung mit der Untersuchung von *Lüers* und *Lorinser* geht am besten aus obiger, aus der Arbeit dieser Herren erhaltenen Kurve hervor. Worauf die starken Abweichungen im p_H-Gebiet 5,5 bis 6,5 beruhen, wird in diesem Laboratorium näher untersucht.

Beiträge zum Studium der Bakterientyrosinase.

Von

C. Stapp.

(Aus dem bakteriologischen Laboratorium der biologischen Reichsanstalt für Land- und Forstwirtschaft Berlin-Dahlem.)

(Eingegangen am 7. Juli 1923.)

Mit 1 Abbildung im Text.

Einleitung.

Die einzige Möglichkeit, sich von der Echtheit eines Leguminosenknöllchenbakterienstammes zu überzeugen, bot bis vor kurzem der Pflanzenversuch. Seit Einführung der serobiologischen Prüfungsmethoden in die landwirtschaftliche Bakteriologie zieht man auch diese zur Erkennung von Knöllchenbakterienreinkulturen heran. Während das erste Verfahren sehr zeitraubend und nicht immer einwandfrei durchführbar ist, erfordert das zweite eine gewisse Übung in der serologischen Technik und ist, sofern man erst die dazu notwendigen Sera herstellen muß, auch recht umständlich. Es fragt sich deshalb, ob nicht andere Bestimmungsverfahren ausgearbeitet werden könnten, die sich bei gleicher Sicherheit einfacher und schneller durchführen lassen. Gedacht war dabei an die Möglichkeit, durch eingehende biologische Studien der Leguminosenknöllchenbakterien eine Reihe streng differentialdiagnostischer Merkmale herauszufinden, mittels deren sich nicht nur die Einordnung der zu bestimmenden Kultur in die große Gruppe der Knöllchenbakterien ermöglichen ließ, sondern aus denen darüber hinaus auch auf ihre bestimmte Artzugehörigkeit geschlossen werden könnte.

Da von mir nach der Inangriffnahme der darauf bezüglichen Untersuchungen zuerst bei den Knöllchenbakterien von *Soja hispida* und später auch bei anderen Knöllchenbakterien das Vorhandensein von *Tyrosinase* festgestellt wurde und über diese Bakterienoxydase bisher nur wenige Veröffentlichungen vorliegen, schien mir ein näheres Eingehen auf die Frage nach dem Vorkommen, den Eigenschaften und der Wirkungsweise dieses Fermentes *bei den Knöllchen- und anderen Bakterien* zweckmäßig.

Geschichtliches.

Die Tyrosinase ist bekanntlich eine in ihrer Wirkung der Phenolase ähnliche Oxydase, die sowohl in Pflanzenzellen wie im Tierkörper aufgefunden worden ist.

Über ihre biologische Bedeutung herrscht insoweit Klarheit, als sie heute allgemein zu den *Atmungsenzymen* gerechnet wird, einer Gruppe von Fermenten, die einen anderweit bereits ohne Mitwirkung des Sauerstoffs eingeleiteten Substanzabbau durch die Vermittlung des Sauerstoffs weiterführen, also an den oxydativen Umwandlungen der Spaltstücke beteiligt sind und die in der abzubauenden Substanz enthaltene potentielle Energie in Arbeit und Wärme umsetzen. Da die Tyrosinase Tyrosin und p-Kresol, d. h. Abbauprodukte der Eiweißstoffe, oxydiert, wird sie, wie die Xanthinoxydase, als Ergänzungsglied der Proteasenreihe angesehen.

Die ersten Angaben über das Vorkommen von Tyrosinase stammen von *Gessard* aus dem Jahre 1901 (1). Er beobachtete, daß eine von *Cassin* entdeckte und von *Radeis* als zur Gruppe der *Pyocyaneus*bakterien gehörig erkannte Mikrobe nur dann ihr rotes und schwarzes Pigment bildete, wenn Tyrosin in dem Kulturmedium vorhanden war, und nannte sie daher *Bacille mélanogène*. Das gebildete Pigment soll demjenigen identisch sein, das Tyrosin unter dem Einfluß von Pilztyrosinase gibt. Das Enzym wurde von ihm weder in der Kultur noch in der wässerigen Lösung gefunden, weshalb *Gessard* annahm, daß es intracellular vorhanden sein müsse.

1902 berichtete *K. B. Lehmann* (2), daß er auf der Suche nach Bakterientyrosinase in verschiedenen Fällen ein Braunwerden des Nährbodens beobachten konnte, wenn er ihm Tyrosin zusetzte. Bei *Bac. fluorescens non liquefaciens* wurde der peptonhaltige Nährboden häufiger ohne jeglichen besonderen Zusatz braun; die Braunfärbung blieb aus, wenn der Nährboden zu gleicher Zeit Zucker enthielt. Für die Annahme, daß das Bakterium aus dem Pepton des Nährbodens bei Fehlen von Zucker Tyrosin abspaltet und letzteres durch eine Oxydase verändert wird, glaubte er dadurch eine Stütze gefunden zu haben, daß bei künstlichem Tyrosinzusatz auch der zuckerhaltige Nährboden braun wurde und sich die Braunfärbung von zuckerfreiem Nährboden noch verstärkte.

D. Carbone (3) züchtete 1906 mehrere Mikroorganismen in sauren und alkalischen Salzlösungen mit und ohne Zusatz von Tyrosin. *Micrococcus melitensis*, *Bac. pestis bubonicae*, *Staphylococcus pyogenes aureus*, *Bac. anthracis* und *Bac. prodigiosus* vermochten keinerlei Färbungen hervorzurufen. *Bac. pyocyaneus* erzeugte eine intensivere Färbung bei Tyrosingegenwart, doch war echte Melanogenese nicht nachzuweisen. Dagegen färbte *Vibrio cholerae* die tyrosinhaltigen, eisenfreien Nährböden charakteristisch bräunlich-orange, die tyrosinfreien, mit Ausnahme der eisenhaltigen, gar nicht. Auch die alten Cholerakulturen in gewöhnlicher Bouillon zeigten einen rötlichbraunen Farbton. Das Berkefeldfiltrat einer tyrosinfreien Kultur gab nach Tyrosinzusatz und Aufbewahren im Brutschrank die charakteristische Färbung nicht. Deshalb wurde die Existenz einer intracellularen Tyrosinase auch bei *Vibrio cholerae* angenommen. *Bac. coli* färbte zwar die tyrosinhaltigen Lösungen braungelb, aber der Farbton

war ein wesentlich anderer als der durch *Vibrio cholerae* erzeugte. Wie *Bac. coli* verhielt sich auch *Bac. icteroides*.

Uyeda (4) beschrieb im gleichen Jahre einen von ihm aus dem Tabak isolierten Bazillus, den er für die Welkkrankheit der Tabakpflanze verantwortlich machte. Dieser *Bac. Nicotianae* soll auf vielen Nährsubstraten einen schwarzen oder grauschwarzen Farbstoff erzeugen und unter anderem Tyrosinase enthalten.

1908 prüften *Lehmann* und *Sano* (5) eine ganze Reihe von Mikroorganismen auf ihre Fähigkeit, Tyrosinnährböden braun zu färben, und fanden nur drei Arten, denen diese Eigenschaft zukam. Am stärksten färbte *Actinomyces chromogenes*. „Schwächer aber ganz unzweifelhaft war die Reaktion bei *Bacterium putidum* und *Bacterium phosphorescens*." Bei *Actinomyces* schien die Intensität der Färbung mit der Wachstumsintensität parallel zu gehen. Bei Versuchen mit verschiedenen Tyrosinmengen trat die Farbstoffbildung am intensivsten und schnellsten auf mit 1,5prom. Tyrosin versetzter Gelatine ein, so daß bei *Bact. phosphorescens* und *Bact. putidum* am nächsten Tage schon dunkelbrauner, bei dem langsamer wachsenden *Actinomyces chromogenes* am zweiten Tage tiefschwarzer Farbstoff gebildet war. Schwächste und langsamste Farbstoffbildung war bei 0,5prom. Tyrosinzusatz eingetreten.

Es gelang nicht, die Tyrosinase durch Lösungsmittel ($^2/_3$ Glycerin + $^1/_3$ Wasser, oder Wasser allein) abzutrennen, „im Gegenteil, es macht den Eindruck, als ob die Oxydation des Tyrosins in der lebenden Zelle stattfände und erst das Oxydationsprodukt nach außen diffundierte".

Einen weiteren Beitrag zur Frage der Tyrosinoxydation durch Bakterien brachte 1911 *Beijerinck* (6). Wenn er auch der erste Forscher ist, der darüber ausführlicher berichtete, so muß doch sein Prioritätsanspruch, den er auf diesem Gebiete geltend macht, bestritten werden. Die angeführten älteren Literaturangaben sind ihm anscheinend unbekannt gewesen. *Beijerinck* beschrieb eine in See- und Grabenwasser vorkommende Mikrobe, die den Cholera- und Leuchtvibrionen nahestehen soll, und der er den Namen *Microspira tyrosinatica* gegeben hat. Durch Züchtung der Reinkulturen in weiten Erlenmeyerkolben in einer leicht alkalischen Natriumtyrosinatlösung mit den nötigen anorganischen Salzen bei 30° konnte er das schwarze Pigment in größeren Quantitäten erzeugen. Die Oxydation ging relativ langsam vonstatten. Daß es sich bei dieser Oxydation um einen enzymatischen Vorgang handelte, bewies *Beijerinck* dadurch, daß er Bouillonagar-Kulturmaterial in Chloroformdampf tötete und dann auf einen Tyrosinagar oder in die entsprechende Nährlösung übertrug. Bei 40° trat dann ziemlich schnell Schwarzfärbung auf. Daß die Reaktionen mit solchem abgetöteten Material nur schwach waren, wurde als nicht überraschend angesehen, da das Enzym, das als wesentlicher Bestandteil des lebenden Protoplasmas betrachtet wird, größtenteils zerstört sei. Die Tyrosinasefunktion der *Microspira tyrosinatica* soll durch unbekannte Einflüsse vollständig verloren gehen können.

1913 erwähnt *Schuster* (7), daß das von ihm entdeckte *Bacterium Xanthochlorum*, dessen pflanzenpathogene Eigenschaften er feststellte, unter bestimmten, nicht näher bekannten Umständen Tyrosinase zu produzieren imstande sei. Die durch das Bakterium hervorgerufene Schwarzfärbung der Stengel von *Vicia Faba* wird auf Tyrosinasewirkung zurückgeführt.

Aus diesen Angaben ist ersichtlich, wie verschwindend gering die Zahl derjenigen Bakterienarten ist, in denen bis jetzt mit Bestimmtheit die Tyrosinase nachgewiesen ist. Darüber, daß sie als ein intrazellulares Enzym betrachtet werden muß, herrscht in allen Fällen, in denen Prüfungen in dieser Hinsicht angestellt worden sind, volle Übereinstimmung.

Tyrosinasenachweis bei Bakterien.

Es war von mir zuerst bei *einem* Stamme der Sojabakterien das Vorhandensein von Tyrosinase beobachtet worden. Später mit mehreren anderen Stämmen derselben Spezies durchgeführte Prüfungen hatten das gleiche Ergebnis gezeitigt. Selbst drei schon jahrelang auf künstlichem Substrat gezüchtete Sojabakterienkulturen, und zwar eine von *Simons* (Dresden) und eine von *Hiltner* (München), sowie eine aus der hiesigen Sammlung stammende und bereits 1910 isolierte Kultur vermochten, wenn auch etwas schwächer als die frisch gewonnenen Stämme, Tyrosin zu oxydieren. Der mit 0,15 Proz. Tyrosin versetzte Nähragar zeigte nach Impfung und einer Bebrütung von 48 Stunden eine deutliche Braunschwarzfärbung der oberen Schicht, und im Verlaufe von 8 Tagen war eine vollständige Dunkelfärbung fast der ganzen Agarschicht eingetreten. Wurden an Stelle von tyrosinhaltigem Agar tyrosinhaltige Nährlösungen angewandt, so trat, entsprechend der Entwicklung der Bakterien, eine braune bis braunschwarze Verfärbung der Lösungen ein.

Nach dieser Feststellung wurden alle zur Verfügung stehenden und erst wenige Monate vorher reingezüchteten Knöllchenbakterien auf die Anwesenheit dieser Oxydase geprüft und außerdem auch noch andere Mikroorganismen in den Kreis der Untersuchungen einbezogen. Über die Befunde gibt folgende Tabelle Aufschluß.

Die Stärke der Tyrosinasewirkung bei den verschiedenen Bakterien ist durch Kreuze gekennzeichnet; + + + = starke, + + = schwächere, + = schwache Tyrosinasewirkung, — = keine Tyrosinasewirkung, ? = Tyrosinasewirkung zweifelhaft.

Sämtliche Knöllchenbakterien waren in einem tyrosinhaltigen Möhrenauszug oder auf einem Möhrenagar mit Tyrosinzusatz gezüchtet, in und auf dem sie alle Wachstum zeigten; in manchen Fällen war auch ein Asparagin-Tyrosin-Mannit-Nährsubstrat angewandt worden. Die Sporenbildner Nr. 60 bis 68 gediehen gut in einer dextrosehaltigen Bouillon mit Tyrosinzusatz oder auf dem entsprechenden Agar, ebenso *Vibrio Dunbar*, *Vibrio Elvers*, *Bac. tumefaciens* und *Bac. mesentericus*. *Bac. pyocyaneus* und *Bac. fluorescens liquefaciens* wuchsen auf gewöhnlichem Bouillonagar mit Tyrosin, ohne Zucker. Azotobakter wurde auf demselben Nährboden gezüchtet wie die Knöllchenbakterien.

Nr.	Mikroorganismen	Tyrosinase
1	Bac. radicicola von Soja hispida (braune Varietät) .	+++
2	„ „ „ „ „ (gelbe „) .	+++
3	„ „ „ „ „ (schwarze „) .	+++
4	„ „ „ „ „ (Stamm Hiltner-München)	++
5	„ „ „ „ „ „ Simons-Dresden)	++
6	„ „ „ Lupinus angustifolius	++
7	„ „ „ „ mutabilis	++
8	„ „ „ „ perennis	++
9	„ „ „ „ californicus	++
10	„ „ „ „ luteus	++
11	„ „ „ „ albus	++
12	„ „ „ Ornithopus sativus	—
13	„ „ „ Phaseolus vulgaris	—
14	„ „ „ Vicia Faba	—
15	„ „ „ „ villosa	—
16	„ „ „ „ sativa	—
17	„ „ „ „ Cracca	—
18	„ „ „ Pisum arvense hibernicum . . .	—
19	„ „ „ „ „ vernale	—
20	„ „ „ „ sativum	—
21	„ „ „ „ Jonardii	—
22	„ „ „ Trifolium pratense	—
23	„ „ „ „ filiforme	—
24	„ „ „ „ hybridum	—
25	„ „ „ „ incarnatum	—
26	„ „ „ Lathyrus silvester	—
27	„ „ „ „ sativus	—
28	„ „ „ „ odoratus	—
29	„ „ „ „ tuberosus	—
30	„ „ „ „ Cicer	—
31	„ „ „ Orobus vernus	—
32	„ „ „ „ tuberosus	—
33	„ „ „ „ niger	—
34	„ „ „ Medicago sativa	—
35	„ „ „ „ lupulina	—
36	„ „ „ Melilotus officinalis	—
37	„ „ „ „ albus	—
38	„ „ „ Onobrychis sativus	—
39	„ „ „ Galega officinalis	—
40	„ „ „ Lens esculenta	—
41	„ „ „ Coronilla varia	+
42	„ „ „ Astragalus glyciphyllos	—
43	„ „ „ „ falcatus	—
44	„ „ „ Genista tinctoria	++
45	„ „ „ Sarothamnus scoparius	++
46	„ „ „ Caragana frutescens	—
47	„ „ „ Amorpha fruticosa	—
48	„ „ „ Tetragonolobus purpureus . . .	++
49	„ „ „ Robinia Pseud-Acacia	—
50	„ „ „ Anthyllis vulneraria	—
51	„ „ „ Ervum Ervilia	—
52	„ „ „ Lotus corniculatus	—
53	„ fluorescens liquefaciens	—
54	„ pyocyan. B. J. L.	—
55	„ „ 183	—
56	„ tumefaciens Smith	—

Nr.	Mikroorganismen	Tyrosinase
57	Bac. phytophthorus Appel	—
58	„ mesentericus niger (Asporogenform)	?
59	„ „ „ Zettnow (sporogen)	?
60	„ lacticola	—
61	„ ellenbachensis	—
62	„ graveolens	—
63	„ luteus Smith et Baker	—
64	„ mycoides	—
65	„ tumescens	—
66	„ robur	—
67	„ alvei Krompecher	—
68	„ „ (aus Bienendarm)	—
69	„ aus einer Mehlmottenlarve isoliert [1]	—
70	Vibrio Dunbar	—
71	„ Elvers	—
72	Azotobacter chroococcum	—
73	„ agile (grün)	—
74	„ „ (rot)	—
75	Actinomyces violaceus [2]	—
76	„ (aus Pollen isoliert)	—

Da immerhin mit der Möglichkeit gerechnet werden konnte, daß durch besondere Kulturbedingungen oder die Darbietung von Tyrosin als einziger Stickstoffquelle bei manchen Mikroben eine sonst nur unmerkliche Tyrosinasewirkung sichtlich verstärkt würde, wurde eine Reihe der oben aufgeführten Bakterien auf einen Nähragar weitergeimpft, der aus etwas modifizierter *Maassen*scher Normalnährlösung (s. *Lehmann-Neumann*, Atlas und Grundriß der Bakteriologie, 6. Auflage, II. Teil, S. 708) hergestellt war, der an Stelle von Asparagin 1,5prom. Tyrosin als Stickstoffquelle und einmal 2 Proz. Rohrzucker, im anderen Falle 2 Proz. Glycerin als weitere Energiequelle zugesetzt war. Diese Nährböden erwiesen sich aber nicht als sonderlich geeignet und nach Vermischen derselben mit je der Hälfte Bouillonagar wurde ein teilweiser Erfolg nur gesehen bei *Bac. mesentericus niger Zettnow* in der einen Versuchsreihe mit Rohrzucker-Tyrosin-Bouillonagar. Hier war im unteren Teile des Röhrchens eine deutliche Dunkelfärbung eingetreten, während sie auf dem gleichen Agar mit Glycerin an Stelle von Rohrzucker und auf anderen Substraten nur sehr gering war.

Eine Braunfärbung des tyrosinhaltigen Nährbodens wurde weiterhin beobachtet bei *Bac. tumefaciens*, *Bac. ellenbachensis*, *Bac. graveolens*, *Bac. luteus* und *Bac. tumescens*. Merkwürdigerweise blieben die Färbungen bei Züchtung dieser letztgenannten Bakterien in tyrosinhaltigen Nährflüssigkeiten nur gering.

---

[1]) Der Bacillus aus der Mehlmottenlarve hatte die Eigenschaft, an der Larve schwarze Flecke hervorzurufen.

[2]) Der Actinomyces-Stamm hatte die Fähigkeit eingebüßt, Farbstoff zu bilden.

Während das Vorhandensein von Tyrosinase bei den untersuchten Knöllchenbakterien von *Soja hispida*, *Lupinus*, *Genista tinctoria*, *Sarothamnus scoparius*, *Coronilla varia* und *Tetragonolobus purpureus* kaum mehr zweifelhaft war — die Nährsubstrate, einerlei ob fest oder flüssig, zeigten stets, sobald Tyrosin zugezogen war und den Knöllchenbakterien die sonstigen Bedingungen zur Entwicklung gegeben waren, nach wenigen Tagen der Bebrütung, je nach der Stärke der in ihnen enthaltenen wirksamen Tyrosinase, eine Braun-, Dunkelbraunschwarz- bis Schwarzfärbung —, ließen die Beobachtungen bei *Bac. tumefaciens* und den Sporenbildnern einen sicheren Schluß noch nicht zu.

Bei den tyrosinasehaltigen Bakterien mußte es gelingen, die Tyrosinoxydation dadurch zu erreichen, daß man eine starke Bakterienaufschwemmung einfach im Reagenzglase mit einer wässerigen Tyrosinlösung mischte. Tatsächlich trat auch bei der Prüfung mit den Tyrosinase enthaltenden Knöllchenbakterien die Oxydation in kurzer Zeit ein. Die fermentative Wirkung ließ sich dadurch noch beschleunigen, daß man die Bakterienaufschwemmung zuvor mit einigen Tropfen Chloroform versetzte, kräftig durchschüttelte und die Prüfung bei erhöhter Temperatur im Wasserbade vornahm. Ausführliches darüber später.

Jedenfalls schien mir dieses Verfahren brauchbar, um in zweifelhaften Fällen entscheiden zu können, ob es sich um eine wahre Tyrosinasewirkung handelt oder nicht. Bei den oben genannten Sporenbildnern und bei *Bac. tumefaciens* blieb, in dieser Weise geprüft, jede Oxydationswirkung aus. Die Braunfärbung des Substrates war bei ihnen demnach *nicht* durch das Oxydationsferment hervorgerufen worden.

Wenn *Fuhrmann* (8) in seinen „*Vorlesungen über Bakterienenzyme*" sagt: „Bei Bakterien scheint diese Oxydase ziemlich weit verbreitet zu sein, ... Es ist ja eine bekannte Erscheinung, daß bei der Zucht vieler Bakterien auf Nähragar eine braune Verfärbung auftritt, die in der Folge mitunter sehr dunkel wird. In zahlreichen Fällen dürfte dieselbe auf eine Oxydation des bei der Eiweißzerlegung gebildeten Tyrosins zurückzuführen sein", so zeigen doch die Beobachtungen an den Sporenbildnern, daß man bei der Beurteilung derartig braungefärbter Bakterienkulturen und ihrer Nährböden recht vorsichtig sein muß. Durch Versuche, auf die später noch zurückzukommen sein wird, konnte festgestellt werden, daß Tyrosin auch ohne Fermentwirkung oxydiert werden kann; es genügt z. B. eine deutliche Alkalität der Substrate, um eine dunklere Färbung hervorzurufen. Da nun eine ganze Reihe von Bakterien den Nährboden, auf dem sie wachsen, in seiner Reaktion in diesem Sinne verändern, so könnte die Oxydation des Tyrosins in manchen dieser Fälle allein durch die Verminderung der Wasserstoffionenkonzentration ihre Erklärung finden. Allerdings

wird niemals dabei das Nährsubstrat dunkelbraunschwarz gefärbt, sondern höchstens dunkelbraun. In diesen Fällen kann also auf die Anwesenheit einer spezifisch wirkenden Oxydase nicht ohne weiteres geschlossen werden.

Ob *Bac. mesentericus niger* Spuren von Tyrosinase enthielt, war mit Sicherheit nicht festzustellen. Die Reinkulturen dieser Stämme sind seit vielen Jahren im hiesigen Laboratorium fortgezüchtet worden, und es ist denkbar, daß, wie es *Beijernick* bei der *Microspira tyrosinatica* beobachten konnte, durch die lange Kultivierung auf künstlichem Substrat die Tyrosinaseaktivität sehr stark geschwächt ist. Die Prüfungen wären mit frisch isoliertem Bakterienmaterial zu wiederholen.

Anna Muschel spricht in einer kürzlich darüber erschienenen Arbeit (9) ihre Meinung dahin aus, daß *Bac. mesentericus niger* keine Tyrosinase, sondern eher eine Polyphenoloxydase bildet. Auf diese Arbeit komme ich noch zurück.

Es fiel bei der Betrachtung der Untersuchungsergebnisse bei den Knöllchenbakterien auf, daß sämtliche geprüften *Lupinus*-Stämme Tyrosinase enthielten, während bei denen von *Ornithopus sativus* die Oxydase nicht nachzuweisen war. Die Knöllchenbakterien dieser beiden Leguminosen stimmen aber, wie die Untersuchungen von *Maassen* und *Müller* (10) ergaben, morphologisch und kulturell vollkommen überein, können sich auch, wie durch Pflanzenversuche bewiesen wurde, gegenseitig vertreten, was von *Simon* (11) bestätigt ist, und sind, nach ihrem agglutinatorischen Verhalten zu urteilen, wie es *Klimmer* und *Krüger* (12) und *Vogel* und *Zipfel* (13) übereinstimmend zeigen konnten, als artgleich anzusprechen. Bei häufig wiederholten Versuchen mit Serradella — mit festen und flüssigen Nährsubstraten und mit konzentrierten Bakterienaufschwemmungen wurden die Prüfungen durchgeführt — blieb jede Oxydation des Tyrosins aus. Ob man den Kultursubstraten auch neben Tyrosin andere Stickstoffquellen, wie Ammonsulfat oder Kaliumnitrat zusetzte, das war ohne Belang, das Ergebnis blieb stets negativ. Es erhob sich deshalb die Frage, wie wird sich die Bakterienreinkultur von Serradella verhalten, die man gewinnen kann aus Serradellapflänzchen, die unter Ausschluß jeder ungewünschten Infektion und nur nach Beimpfung mit Reinkulturen von *Lupinus* herangezogen werden! Derartige, im Sommer 1922 zwar angesetzte, leider aber nicht einwandfrei durchführbare Züchtungsversuche sollen noch ausgeführt werden, und ich behalte mir vor, darüber später ergänzend zu berichten.

Analoge Unterschiede wie zwischen Lupinen und Serradella liegen auch vor zwischen *Tetragonolobus purpureus* einerseits und *Anthyllis vulneraria* sowie *Lotus corniculatus* andererseits. Auch hier sollen Züchtungsversuche noch näheren Aufschluß bringen.

Verhalten von Bakterientyrosinase gegen verschiedene Tyrosine und einige andere cyklische Verbindungen.

Es war bei den ersten allgemeinen Prüfungen auf Bakterientyrosinase ein aus der Vorkriegszeit stammendes Tyrosin der Firma *Kahlbaum* (Berlin) verwandt worden, das eine rein weiße Farbe und feinpulverige Beschaffenheit besaß. Ein 1922 bezogenes Tyrosin derselben Firma, das ebenfalls rein weiß, aber mehr leichtflockig war, doch dieselben Löslichkeitsverhältnisse zeigte wie das alte, gab, unter denselben Bedingungen angewandt, stets schwächere Reaktionen. War der Nährboden mit Zusatz des alten Präparates nach Beimpfung mit Soja und Bebrütung meist tiefschwarz gefärbt, so trat bei Verwendung des neuen Tyrosins nur eine Braunschwarzfärbung auf. Es mußten also zwischen den Tyrosinen Unterschiede bestehen, die rein biologisch nachweisbar waren.

Leider war es nicht mehr möglich, die Ursache der Verschiedenheit dieser beiden Handelspräparate ein und derselben Firma mit Sicherheit zu ergründen, weil bereits das alte Tyrosin restlos aufgebracht war, als das neue geliefert wurde.

Der Vorfall gab Veranlassung, eine Anzahl Tyrosine auf ihre Brauchbarkeit zu prüfen. Neben dem neuen *Kahlbaum*schen Tyrosin stand mir noch ein von der Firma *Altmann* bezogenes Tyrosin (das jedenfalls auch von der Firma *Kahlbaum* herrührt) sowie ein im bakteriologischen Laboratorium früher hergestelltes Tyrosin aus Hornspänen und ein auf biologischem Wege aus Pepton durch die Tätigkeit von *Bac. esterificans seu Bac. praepollens* gewonnenes Tyrosin zur Verfügung. Ein weiteres Tyrosin wurde von mir biologisch aus Wittepepton mit Hilfe von *Vibrio Dunbar* hergestellt.

Die Untersuchungen von *Abderhalden* und *Guggenheim* (14) haben ergeben, daß Tyrosine mit verschiedenem optischen Drehungsvermögen auch verschieden sind in bezug auf ihre Oxydierbarkeit durch Pilztyrosinase; so wird z. B. d-Tyrosin von Tyrosinase aus *Russula delica* schwerer angegriffen als die linksdrehende Modifikation.

Das natürliche Tyrosin soll bekanntlich in salzsaurer Lösung den polarisierten Lichtstrahl nach links drehen, dagegen soll das synthetische Tyrosin als eine razemische Vereinigung von d- und l-Tyrosin zu betrachten sein.

Das optische Verhalten der verschiedenen Tyrosine mußte also zuerst festgestellt werden. Zu diesem Zweck wurden sie zu je 2 Proz. in Salzsäure vom spez. Gew. 1,105 gelöst und in dieser Stärke zur Polarisation verwandt.

Das *Altmann*sche Tyrosin drehte deutlich, wenn auch schwach nach rechts, das Tyrosin aus Horn deutlich nach links. Das Tyrosin der Firma *Kahlbaum* und die biologisch durch *Bac. praepollens* und *Vibrio Dunbar* gewonnenen Tyrosine lenkten den polarisierten Lichtstrahl überhaupt nicht nennenswert ab. Ob es sich bei allen diesen Präparaten um reine

Tyrosine handelt, ist mehr als zweifelhaft. Aus der optischen Drehung wird man nicht auf die d- oder l- oder razemische Modifikation schließen dürfen, sondern es wird wohl ein mehr oder weniger hoher Gehalt des l-Tyrosins an d-Leucin die Ursache des verschiedenen optischen Verhaltens sein.

Auffallend war die Schwerlöslichkeit des mit Hilfe des *Bac. praepollens* gewonnenen Produktes in Wasser. Infolge dieser seiner Eigenschaft war es zum Nachweis der Bakterientyrosinase auch ungeeignet. Das durch *Vibrio Dunbar* aus Pepton erhaltene Tyrosin stand in seinem Werte mit dem neuen *Kahlbaum*schen Präparat etwa gleich. Das von *Altmann* bezogene Präparat wurde von Bakterientyrosinase etwas langsamer oxydiert als die beiden vorhergenannten, und das Tyrosin aus Horn eignete sich, trotz seiner trüben Löslichkeit in Wasser, von den untersuchten Präparaten am besten zur Oxydation durch die Bakterienoxydase. Es wurden aber damit doch noch nicht die Schwarzfärbungen der Substrate erreicht wie mit dem alten *Kahlbaum*schen. Es scheint also, daß das Vorkriegspräparat von *Kahlbaum* allein größere Reinheit besaß, während die geprüften einen verschieden hohen Gehalt an Leucin haben dürften.

Erwähnt sei noch, daß *Beijerinck* (15) zur Ausführung der Tyrosinasereaktion ein aus Peptonlösung mit Hilfe von Pankreatin selbst herzustellendes Tyrosin empfiehlt.

Von den Salzen des Tyrosins eignet sich das Natriumtyrosinat gut zum Tyrosinasenachweis. Weniger brauchbar ist das tyrosinsulfosaure Salz. Das Bariumsalz der Tyrosinsulfosäure wird zwar auch durch die Bakterientyrosinase oxydiert, aber wesentlich langsamer und auch schwächer.

Diese Verzögerung der Oxydation beobachteten *Abderhalden* und *Guggenheim* (14) schon bei der Einwirkung von Pilztyrosinase auf tyrosinhaltige Polypeptide auch dann, wenn der Gehalt an l-Tyrosin in den beiden Parallelversuchen gleich war.

Nahm man 4 ccm der Bariumsalzlösung, die auf folgende Weise hergestellt war:

0,3 g Tyrosin im Porzellanschälchen mit 2 ccm konzentrierter reiner Schwefelsäure übergossen, das Tyrosin darin gelöst und eine halbe Stunde auf dem kochenden Wasserbade erhitzt, darauf mit etwa 10 bis 15 ccm Wasser verdünnt und mit fein zerriebenem Bariumkarbonat bis zur neutralen Reaktion versetzt, die Lösung vom Niederschlag abfiltriert und der Niederschlag auf dem Filter ausgewaschen, das klare Filtrat auf dem Wasserbad ganz wenig eingedampft, um festzustellen, ob sich eventuell gelöstes Bariumkarbonat ausscheiden würde, dann auf 25 ccm aufgefüllt (eine Probe dieser neutralen klaren Lösung gab auf vorsichtigen Zusatz sehr verdünnter neutraler Eisenchloridlösung sofort die charakteristische Violettfärbung; siehe *Beilstein*, Handbuch d. organ. Chemie, 3. Aufl., 2, 1569, 1896),

und setzte 1 ccm Bakterienaufschwemmung von Soja und 5 Tropfen Chloroform zu, so trat bei Zimmertemperatur erst nach zweistündigem Stehen eine ganz minimale Verfärbung ein, die allmählich deutlicher wurde, aber nicht die Stärke erreichte, wie sie die Kontrollösung mit Tyrosin bereits nach einer halben Stunde aufwies. Wurde die Bariumsalzlösung mit der fünffachen Menge Wasser verdünnt, dann mit Bakterienaufschwemmung vermischt, so blieb die Oxydation überhaupt aus. Das ist deswegen auffallend, weil in dieser verdünnten Lösung immer noch die etwa 0,2 Proz. Tyrosin entsprechende Menge sulfosauren Salzes enthalten sein muß.

Ähnlich wie mit dem tyrosinsulfosauren Salze verhielt es sich auch mit dem aus Tyrosin hergestellten Oxyphenyläthylamin.

Zur Gewinnung dieses Körpers wurde nach der von *Schmitt* und *Nasse* (16) angegebenen Methode verfahren. Es resultierte dabei eine gelbliche, stark alkalisch reagierende Flüssigkeit; ein Teil davon wurde unverändert mit Sojabakterienaufschwemmung + Chloroform gemischt, ein anderer Teil tropfenweise mit verdünnter Salzsäure bis fast zur neutralen Reaktion versetzt, dann ebenso mit Bakterienaufschwemmung vermischt und beide Reagenzgläser bei Zimmertemperatur aufgestellt.

Die Mischung mit dem salzsauren Oxyphenyläthylamin war nach 2 Stunden deutlich, wenn auch nicht stark gefärbt, die Aufschwemmung mit der freien Base ließ erst viel später eine ganz schwache Verfärbung und einen schwach dunkelgefärbten Bodensatz erkennen. Die Ursache der so geringen Oxydation der freien Base mag darin zu suchen sein, daß das oxydierende Enzym durch die zu starke alkalische Reaktion in seiner Wirkung gehemmt wird.

Bertrand (17), der bei der Prüfung mit Kleietyrosinase ebenfalls eine Oxydation des Oxyphenyläthylamins und außerdem noch die Oxydierbarkeit einer ganzen Reihe von anderen Oxyphenylverbindungen festgestellt hat, mit den entsprechenden Phenylverbindungen aber keine Oxydation erzielte, kommt deshalb zu dem Schluß, daß wahrscheinlich die Oxyphenylgruppe bei der Oxydation die wichtigste Rolle spielt und die Größe und Natur der Seitenkette erst in zweiter Linie in Frage kommt. Durch die Untersuchungen von *Abderhalden* und *Guggenheim* (14) ist die Zahl der durch Pilztyrosinase als oxydierbar nunmehr bekannten Oxyphenylverbindungen noch vergrößert worden. Die von ihnen mit negativem Erfolg geprüften Körper, wie Phenylamidoessigsäure, Phenylessigsäure, Salicylsäure und ihr Natriumsalz, α- und β-Naphthol und Anilin, waren auch durch Bakterientyrosinase nicht oxydierbar.

Es seien hier der Übersichtlichkeit halber einige von *Abderhalden* und *Guggenheim* bei der Einwirkung eines Tyrosinaseauszuges aus *Russula delica* auf Tyrosin, Phenole und andere aromatische Körper, teilweise unter Zusatz von Aminosäuren, erzielte Resultate vergleichend in nachstehender Tabelle mit den von mir ausgeführten Untersuchungen mit einer wässerigen Aufschwemmung von Sojaknöllchenbakterien

zusammengestellt. Auch seien noch einige, die Widerstandsfähigkeit der beiden Tyrosinasen gegen Säure und Alkali betreffende Ergebnisse mit angeschlossen.

Nr.	Angewandte Menge der zu oxydierenden Substanz	Angewandte Menge Pilzauszug oder Bakterienaufschwemmung	Zusatz	Reaktion mit Fermentauszug von Russula delica	Reaktion mit Bakterienaufschwemmung von Soja hispida	Beginn der Färbung	Versuchstemperatur
1	4 ccm m/10 Phenollösung	1 ccm	1 ccm Wasser	Braunfärbung	Schwache Braun-, dann Rosafärbung	3′	40°
2	Dasselbe		1 ccm m/10 Glykokoll	Cochenille-, später Violettfärbung	Cochenillefärbung, die nach etwa 30′ in Blauviolett umschlägt	3	40
3	Dasselbe		1 ccm m/10 α-Alanin	—	Schwache Cochenillefärbung, die beständig ist	15	40
4	Dasselbe		1 ccm m/10 Asparagin	—	Schwache Rosafärbung, die langsam verblaßt	15	40
5	4 ccm Amidophenollösung (kalt gesättigt)		—	Schnellere Braunfärbung als Kontrolle	Schnellere Braunfärbung als Kontrolle	—	17
6	4 ccm Anilinwasser		—	Unverändert	Unverändert	—	40
7	4 ccm α-Naphthollösung		—	„	„	—	40
8	4 ccm m/300 Tyrosinlösung		1 ccm Wasser	Sofort eintretende Färbung	Rosa-, dann Braunschwarzfärbung	3	40
9	Dasselbe		1 ccm m/100 Glykokoll	Fast sofort eintretende Färbung	Rosa-, dann Braunfärbung	3	40
10	Dasselbe		1 ccm m/10 Glykokoll	—	Dasselbe	5	40
11	Dasselbe		1 ccm m/1 Glykokoll	Färbung etwas später auftretend	Schwächere Rosa-, später Braunfärbung	8	40
12	Dasselbe		1 ccm m/10 α-Alanin	Etwas später eintretende Färbung als bei m/100 Glykokoll	Rosa-, dann Braunfärbung	5	40
13	Dasselbe		1 ccm n/10 NaOH, Neutralisation nach 10′ bei 17°	Schnell auftretende Rotfärbung	Rosafärbung	5	40
14	Dasselbe		1 ccm n/10 HCl, Neutralisation nach 10′ bei 17°	Keine Färbung	Ganz schwache Rosafärbung	10	40
15	Dasselbe		1 ccm n/10 NaOH, Neutralisation nach 15′ bei 40°	—	Keine Färbung mehr	—	—
16	Dasselbe		1 ccm n/10 HCl, Neutralisation nach 15′ bei 40°	—	Dasselbe	—	—
17	Dasselbe		1 ccm n/10 NaOH, Neutralisation nach 60′ bei 17°	Langsame Braunfärbung	Rosafärbung	20	40

Abgesehen von den Unterschieden in der Schnelligkeit des Reaktionseintritts mit Pilztyrosinase einerseits und Bakterientyrosinase andererseits, die nur durch die Konzentrationsdifferenz bedingt sind, dürfte sich beim Vergleich eine weitgehende Übereinstimmung zwischen Pilz- und Bakterientyrosinase ergeben.

Daß die Bakterienaufschwemmung nach Zusatz von 1 ccm n/10 HCl und 10 Minuten langer Einwirkungsdauer noch schwach wirksame Tyrosinase enthielt, die Pilztyrosinase nach dieser Zeit aber völlig

inaktiviert war, wird seinen Grund wahrscheinlich darin haben, daß die Säure auf das Ferment in dem Pilzauszug leichter einzuwirken imstande war, als in der stark schleimigen Bakterienaufschwemmung.

Hat *Abderhalden* für die Pilztyrosinase gezeigt, daß bei der Oxydation des Tyrosins die Gegenwart geringer Mengen von Aminosäuren[1]) auf die Färbung ohne Einfluß ist, so gilt das ebenfalls, wie aus obiger Tabelle ersichtlich ist, für die Bakterientyrosinase. Bei der Oxydation des Phenols durch Bakterientyrosinase tritt zuerst eine schwache Braunfärbung auf, die bald in Rosa umschlägt. Setzt man dem Phenol Glykokoll zu, so wird eine Cochenillefärbung hervorgerufen, die nach etwa einer halben Stunde in Blauviolett übergeht. Nimmt man an Stelle des Glykokolls α-Alanin, so ist die zu Anfang auftretende Cochenillefärbung beständig. Bei Zusatz von Asparagin entsteht eine schwache Rosafärbung, die allmählich wieder verblaßt.

Die Färbungen des Phenols werden demnach durch die Anwesenheit geringer Mengen von Aminosäuren, im Gegensatz zu denen des Tyrosins, beeinflußt.

Die gleichen Versuche mit Phenollösung allein, Phenollösung + Glykokoll und Phenollösung + α-Alanin wurden auch mit Bakterienaufschwemmungen von *Bac. prodigiosus*, *Bac. pyocyaneus* und *Vibrio Dunbar* an Stelle von Sojabakterien gemacht. Die hierzu benutzten Kulturen waren in der einen Reihe 2, in der zweiten 8 und in einer dritten 14 Tage alt. In keinem Falle trat innerhalb von 4 Stunden eine Oxydationswirkung ein. Diese Bakterien sind nicht befähigt, Tyrosin zu oxydieren, sie vermögen aber auch nicht, das Phenol, weder mit noch ohne Zusatz von Aminosäuren, durch Oxydation zu färben.

Auf ihre Oxydierbarkeit durch Sojabakterientyrosinase wurden von mir weiterhin noch folgende Säuren geprüft:

Phenylglykolsäure,
Ortho-Amidobenzoesäure,
Dioxybenzoesäure (OH in 2 : 4-Stellung = β-Resorcylsäure),
Dioxybenzoesäure (OH in 2 : 5-Stellung = Gentisinsäure),
Dinitrobenzoesäure (NO_2 in 2 : 4-Stellung),
Dinitrobenzoesäure (NO_2 in 2 : 5-Stellung) und
Hydrozimtsäure.

Nach Neutralisation mit der bezeichneten Menge Natronlauge wurden bestimmte, aber wechselnde Mengen der Lösungen mit Mannitnährlösungen gemischt und nach Impfen mit Sojabakterien bei Zimmertemperatur aufgestellt.

---

[1]) Eine Ausnahme machen die stark sauren Charakter besitzenden Aminosäuren: d-Glutaminsäure und l-Asparaginsäure; sie hemmen bereits in einer m/100 Verdünnung.

Die neutralisierte Gentisinsäurelösung war an sich schon schwach bräunlich gefärbt und zeigte in den angesetzten Versuchsreihen nach 14 Tage langer Bebrütung eine dunklere Färbung; doch diese stärkere Braunfärbung wurde auch von tyrosinasefreien Bakterien hervorgerufen und kann demnach nicht als eine spezifische Wirksamkeit dieser Oxydase betrachtet werden. Ähnlich, aber schwächer, war die Färbung in den Lösungen mit β-Resorcylsäure. Die anderen Lösungen waren nach dieser Zeit ungefärbt. Wurden zu den Prüfungen Sojabakterienaufschwemmungen benutzt, die den neutralisierten m/10 starken Lösungen zugefügt wurden, dann zeigte nur die die β-Resorcylsäure enthaltende Mischung eine Veränderung; sie war schwach rötlich gefärbt.

Bemerkt sei hier noch, daß die Bakterientyrosinase durch Hydroperoxyd — es liegen über den Einfluß von Wasserstoffsuperoxyd auf pflanzliche Tyrosinase die widersprechendsten Angaben vor — bestimmt nicht stärker aktiviert wird, aber auch eine hemmende Wirkung bei Verwendung nur dünner Lösungen nicht festzustellen war.

Daß unter gewissen Bedingungen in Tyrosinlösungen, die ohne jeden Fermentzusatz bei Bruttemperatur aufbewahrt werden, nach einiger Zeit Verfärbungen eintreten, die auf eine Zersetzung des Tyrosins schließen lassen, darauf wurde eingangs bereits hingewiesen. Nach *Carbone* (3) sollen neutrale oder schwach saure sterile Tyrosinlösungen beim Aufbewahren im Thermostaten eine gelbliche Färbung annehmen, alkalische sollen in 8 Tagen tief goldgelb oder braungelb werden.

Zur Nachprüfung wurden folgende Tyrosinlösungen mit dem neueren *Kahlbaum*schen Tyrosin hergestellt und nach Sterilisation bei 20° und bei 37° aufbewahrt.

1. 0,15 Proz. Tyrosin in m/15 primärem Kaliumphosphat.
2. 0,15 „ „ „ m/7,5 „ „
3. 0,15 „ „ „ n/10 Salzsäure.
4. 0,15 „ „ „ m/15 sekundärem Natriumphosphat.
5. 0,15 „ „ „ m/7,5 „ „
6. 0,15 „ „ „ n/10 Natronlauge.
7. 0,15 „ „ „ n/10 Natriumkarbonatlösung.
8. 0,15 „ „ „ Wasser (Kontrolle).

Die Lösungen Nr. 6 und 7 waren bereits nach dem Erhitzen ganz schwach gelb gefärbt, alle anderen Lösungen farblos. Nach 14tägigem Stehen waren die sauren Lösungen Nr. 1 bis 3, ebenso wie die Kontrolle, völlig farblos. Nr. 4 war schwach, Nr. 5 etwas stärker, doch ebenfalls noch schwach grünlichgelb gefärbt, Nr. 6 und 7, also die mit Natronlauge und -karbonat alkalisch gemachten Lösungen besaßen einen tiefgelben bis braungelben Farbton. Braunschwarz- oder Schwarzfärbungen, wie sie durch Tyrosinase hervorgerufen werden, traten

niemals ein. Daß aber auf tyrosinhaltigen Substraten allein durch die von den Bakterien erzeugte stärkere Alkalität dunklere Färbungen hervorgerufen werden können, wird nach dem obigen Versuchsausfall kaum noch zweifelhaft sein. Man darf sie deshalb auch nicht ohne weiteres als Wirkung eines Oxydationsfermentes ansprechen, wenn dessen Anwesenheit nicht in anderer Weise feststellbar ist.

Nachweis der endoenzymatischen Natur der Bakterientyrosinase.

Mischt man gleichstarke Bakterienaufschwemmungen von Soja oder Lupinen, von denen der eine Teil lebenskräftige Zellen, der andere mit Chloroform abgetötete Bakterienleiber enthält, mit Tyrosinlösungen und verfolgt den Beginn der eintretenden Färbung, so wird man stets beobachten, daß in der ersten Mischung das Tyrosin zeitlich langsamer oxydiert wird als in der Aufschwemmung mit den toten Zellen. Wäre das Enzym von der lebenden Zelle nach außen abgeschieden, wäre es also extrazellulär, so müßte in beiden Fällen die Farbstoffbildung zu gleicher Zeit eintreten. Die in dem einen Falle immer zu beobachtende Reaktionsbeschleunigung spricht aber dafür, daß die Tyrosinase als Endoenzym vorhanden sein muß.

Setzt man zù 10 ccm einer Sojabakterienaufschwemmung 10 bis 15 Tropfen Chloroform, schüttelt kräftig durch und läßt dieselbe in einem mit Kork fest verschlossenen Reagenzglase stehen, so oxydiert diese Aufschwemmung auch noch nach einer Woche deutlich zugesetztes Tyrosin. Selbst die doppelt und dreifach zugefügte Chloroformmenge übte keine erkennbar schädigende Wirkung auf die Aktivität des Fermentes aus. Das beweist, daß die Tyrosinase nicht „als ein wesentlicher Bestandteil des lebenden Protoplasmas“ angesehen werden kann, wie *Beijerinck* es tut.

Warum *Beijerinck* nach Abtötung der Bakterienkultur im Chloroformdampf stets nur eine schwache Oxydation beobachtete, wird vielleicht durch folgenden Versuch verständlich.

Bei einigen Schrägagarkulturröhrchen von Soja, die mehrere Tage bebrütet waren, wurde der Wattepfropf etwa 4 cm tief eingedrückt und ein zweiter Wattepfropf aufgesetzt, der mit ganz wenig Chloroform getränkt war. Es kam darauf an, nur eine Chloroformatmosphäre zu schaffen und nicht das flüssige Chloroform mit der Bakterienkultur in Berührung zu bringen. Darauf wurden die Röhrchen, mit Stanniol und Gummikappe abgedichtet, bei 28° in den Brutschrank gestellt. Nach 24 Stunden wurden die Kulturen abgeschwemmt und, mit Tyrosinlösungen gemischt, bei 40° ins Wasserbad gebracht. Trotz mehrfacher Wiederholung der Versuche war nicht ein einziges Mal eine Oxydation des Tyrosins zu beobachten. Wahrscheinlich sind durch die ganz allmähliche Einwirkung des Chloroformdampfes auf die in gutem

Wachstum befindlichen Kulturen tiefgreifende Änderungen in der Struktur des Zellplasmas oder sogar des gesamten Zellinhaltes eingetreten, die die Inaktivität der Oxydase verursacht, vielleicht auch das Ferment selbst völlig zerstört haben.

Beließ man die Kulturen nur wenige Stunden bei 28° im Chloroformdampf und benutzte sie dann zur Tyrosinoxydation, so konnte man, je nach der Dauer der Einwirkung des Chloroformdampfes, ein allmähliches Abklingen der Oxydasewirksamkeit beobachten. Mit solchen stärker geschwächten Kulturen wird auch *Beijerinck* gearbeitet haben.

Es ist demnach besonders bemerkenswert, daß die *Art des Abtötens* mit Chloroform auf die Wirksamkeit der Tyrosinase von größtem Einfluß ist.

Wenn *Anna Muschel* (9) zum Tyrosinasenachweis bei *Bac. mesentericus* in folgender Weise vorgeht: „Traubenzuckeragar wurde mit einer Reinkultur von *Bac. mesentericus niger* beimpft. Nach einiger Zeit war der Nährboden braunschwarz geworden, die Bakterien waren üppig gewachsen. Nach 3 Wochen wurde dieser Nährboden durch 24 Stunden bei 37° mit Toluolwasser extrahiert (1 ccm Toluol auf 100 ccm destillierten Wassers). Die braungefärbte, schwach alkalisch reagierende Fermentlösung, die einen an Heringslake erinnernden Geruch zeigte, wurde nun, ... auf verschiedene aromatische Verbindungen einwirken gelassen", so ist es, wenn dabei Tyrosin- und Phenollösung innerhalb 20 Stunden bei 37° nicht verändert wurden, nach den von mir gemachten Erfahrungen nicht unwahrscheinlich, daß durch das einfache Übergießen der auf dem Substrat festhaftenden Kultur mit Toluolwasser und Stehenlassen bei 37° eine ähnliche langsame Abtötung und damit Inaktivierung der möglicherweise vorhandenen Tyrosinase erreicht wird, wie sie meinerseits mit im Chloroformdampf abgetöteten Sojabakterienkulturen beobachtet werden konnte, ganz abgesehen davon, daß durch das bloße Ausziehen der Kultursubstrate eine Lösung der Bakterientyrosinase jedenfalls nicht zu erzielen ist.

Wie durch Chloroform ließ sich auch durch Zusatz anderer Agenzien zu den Bakterienaufschwemmungen eine Reaktionsbeschleunigung herbeiführen. Das zeigt die nachstehende Tabelle. Angewandt wurden je 4 ccm einer 0,15proz. Tyrosinlösung, der je 1 ccm einer Bakterienaufschwemmung von *Soja hispida* und je 5 Tropfen der in der Tabelle angegebenen Abtötungsmittel hinzugefügt worden waren.

Abtötungsmittel (je 5 Tropfen)	Dauer bis zum Eintritt der Reaktion bei 40° in Minuten	Abtötungsmittel (je 5 Tropfen)	Dauer bis zum Eintritt der Reaktion bei 40° in Minuten
Chloroform	3	Amylalkohol	5—6
Aceton	4—5	Ohne Zusatz	12—15
Chloroform-Acetonmisch.	3—4		

Danach eignete sich am besten Chloroform, fast ebensogut eine aus gleichen Teilen Chloroform und Aceton bestehende Mischung, dann erst kam Aceton allein, und noch weniger schnell wirkte Amylalkohol.

Auch durch inniges Zerreiben der Bakterienkultur mit Quarzsand und dadurch bedingtes Zerreißen der Zellen konnte die Oxydation des Tyrosins beschleunigt werden.

Filtrierte man eine mit Chloroform versetzte Bakterienaufschwemmung durch ein dreifaches Papierfilter, so erzielte man ein zwar nicht bakterienfreies, wohl aber bakterienärmeres Filtrat, das die Tyrosinlösung genau ebenso schnell und ebenso stark zu oxydieren vermochte, wie die nicht filtrierte Aufschwemmung. Ließ man dieses Papierfiltrat aber weiterhin ein poröses Porzellanfilter passieren, dann erhielt man ein wasserklares vollkommen zellfreies Filtrat, das nicht die geringste Oxydationswirkung besaß, also keine Tyrosinase mehr enthielt. Natürlich ließ sich auch in der direkt durch das Papierfilter filtrierten Bakterienaufschwemmung Tyrosinase nicht mehr zum Nachweis bringen.

Dieser Befund deckt sich also mit dem von *Carbone* (3), der im Berkefeldfiltrat von *Vibrio cholerae* nach Tyrosinzusatz keine Färbung mehr wahrnehmen konnte.

Zerrieb man die Bakterienkultur kräftig und längere Zeit im Mörser mit Sand, wodurch ein Zerreißen der Zellmembranen und ein Austreten der Zellinhaltsstoffe bewirkt werden sollte, schwemmte mit wenig Wasser ab und filtrierte dann durch ein Tonfilter, so zeigte auch dieses Filtrat keine tyrosinoxydierende Kraft.

Aus Kartoffeln und Weizenkleie ließ sich nach *Lehmann* und *Sano* (5) ein durch Papier filtrierbares Fermentgemisch extrahieren, das Tyrosin bräunte. Das Tonzellfiltrat gab aber ebenfalls keine Tyrosinreaktion. Zur Erklärung dieser Erscheinung werden folgende Möglichkeiten in Betracht gezogen: „Vielleicht ist die Tyrosinase nur in sehr kleiner Menge vorhanden, oder es sind zum Sichtbarmachen der Tyrosinreaktion besonders große Mengen eines gemeinsamen Oxydationsfermentes nötig. Die Tyrosinase könnte aus irgendwelchen chemisch-physikalischen Eigenschaften im Filter zurückbleiben, man könnte daran denken, daß sie gar nicht gelöst ist."

Die ersten beiden Möglichkeiten können, wie die späteren Versuchsergebnisse beweisen, für die Bakterientyrosinase keine Geltung haben, wohl aber darf es als sehr wahrscheinlich angesehen werden, daß die Kolloidnatur, also der chemisch-physikalische Zustand des Fermentes, die Filtrierbarkeit durch Porzellan- oder Tonfilter unmöglich macht. Diese Annahme schließt gleichzeitig die letzte Möglichkeit in sich, denn bei einem Kolloid pflegt man nicht von einer „wahren Lösung" zu reden.

Wenn man als Grund für die Verringerung der Wirksamkeit durch Tonfilter filtrierter Katalaselösung annimmt — wie das bekanntlich ja geschieht —, daß ein Teil der kolloidalen Katalase im Filter zurückgehalten worden ist, so wird man vielleicht nicht fehlgehen, wenn man sich bei der Tyrosinase die Teilchen gröber vorstellt, als sie bei der Katalase sind, so daß sie sämtlich das Tonfilter nicht passieren können.

Bestimmung der Inaktivierungstemperatur für Bakterientyrosinase.

Nach den Untersuchungen von *Bertrand* und *Rosenblatt* (18) haben pflanzliche Tyrosinasen verschiedenen Ursprungs auch verschiedene Tötungstemperaturen. Die am wenigsten widerstandsfähigen Enzyme waren bereits bei Temperaturen zwischen 60 und 65° inaktivierbar, die widerstandsfähigsten hielten noch ein Erhitzen auf 90° aus. Bei den Pilztyrosinasen z. B. wurden folgende Verschiedenheiten festgestellt.

Die Tyrosinase von *Amanita rubescens* und *Tricholoma nudum* war zwischen 60 und 65° inaktiviert, die von *Tricholoma grammopodium* und *Russula lepida* zwischen 65 und 70°, die von *Russula queletti*, *Russula rubra* und *Russula delica* zwischen 70 und 75°, und endlich die von *Hypholoma fasciculare* erst zwischen 75 und 80°.

Es war deshalb zu prüfen, bei welcher Temperatur die Bakterientyrosinase inaktiviert wird und ob auch hier Unterschiede in der Widerstandsfähigkeit auftreten. Zu diesem Zwecke wurden Reagierröhrchen mit je 4 ccm Tyrosinlösung in Wasserbädern verschieden hoher Temperatur gehalten, den verschiedenen Reihen je gleiche Mengen (1 ccm) der Bakterienaufschwemmung, sowie jedem Röhrchen 5 Tröpfchen Chloroform zugesetzt und durchgeschüttelt. Die Ergebnisse sind in der Tabelle niedergelegt.

Temperatur	Beobachtungszeit	Tyrosinoxydation bei den Aufschwemmungen der Bakterien aus				
		Soja (braune Varietät)	Soja (schwarze Varietät)	Lupinus angustifol.	Lupinus mutabilis	Sarothamnus scoparius
40°	5′	+	+	+	+	+
45	5	+	+	+	+	+
50	5	+	+	+	+	+
55	5	+	+	+	+	+
60	5	+	+	+	+	+
65	60	—	—	—	—	—
70	60	—	—	—	—	—

Die gleichen Temperaturversuche wurden wiederholt und an Stelle der Tyrosin- eine Phenollösung angewandt. Das Ergebnis war ein mit dem obigen völlig übereinstimmendes.

Daraus erhellt, daß die Tyrosinasen der untersuchten Bakterienstämme alle bei Temperaturen, die zwischen 60 und 65° liegen, inaktiviert werden.

Ob durch diese Inaktivierung auch zugleich eine Zerstörung des Fermentes herbeigeführt wird, wissen wir damit noch nicht. Nach *Bayliss* (19) kann bei einigen Fermenten die Inaktivierung durch Hitze als Folge einer Teilchenvergröberung, aber nicht als Zerstörung angesehen werden. Beim Speichel z. B., der durch Erhitzen inaktiviert war, wurde gefunden, daß er seine fermentative Kraft wieder erlangte, wenn man ihn kräftig mit Luft schüttelte. Derartige, mit Bakterientyrosinase ausgeführte Versuche ließen erkennen, daß es sich bei der Inaktivierung der Tyrosinase durch Hitze bei Temperaturen von 65 bis 70° nicht um einen irreversiblen Vorgang handelt, daß hier also nicht Inaktivierung und Zerstörung zusammenfallen, sondern daß die Inaktivierung durch häufiges Schütteln oder besser durch Hindurchleiten eines Sauerstoffstromes reversibel war.

Bei Stämmen, die längere Zeit auf Möhrenagar fortgezüchtet worden waren, ließ sich zum Teil ein Schwächerwerden der Tyrosinasewirkung erkennen. Es wurden deshalb auch mit solchen älteren Stämmen erneut Untersuchungen über die Widerstandsfähigkeit der in ihnen enthaltenen Tyrosinase gegen Hitze ausgeführt; dabei wurde die überraschende Beobachtung gemacht, daß die Tyrosinase der Sojabakterien ihre Resistenz behalten hatte, daß dagegen diejenige von *Lupinus mutabilis* zwischen 55 und 60° und von *Sarothamnus scoparius* zwischen 50 und 55° inaktiviert war, während auf 50° erhitzte Bakterien von *Genista tinctoria* bereits keine Tyrosinoxydation mehr ermöglichten.

Vielleicht sind auch die Unterschiede in der Temperaturresistenz bei den Pilzen auf die gleiche oder eine ähnliche Ursache zurückzuführen.

Einfluß der Temperatur auf die Reaktionsgeschwindigkeit der Bakterientyrosinase.

Zu den Versuchen, die zur Feststellung des Temperatureinflusses auf die Reaktionsgeschwindigkeit dienten, wurden bakterienreiche und bakterienärmere Abschwemmungen von verschieden alten Sojabakterienkulturen auf Möhrenagar benutzt, und es wurde im übrigen genau so verfahren wie bei der Bestimmung der Inaktivierungstemperatur. Zu je 4 ccm der Tyrosinlösung, die jeweils die in der Tabelle angegebene Temperatur besaß, wurden, die Röhrchen im Wasserbade stehen lassend, je 1 ccm Bakterienaufschwemmung und das Chloroform hinzugegeben, und es wurde nach Möglichkeit auch im Wasserbade umgeschüttelt.

Temperatur	Beginn der Färbung bei der älteren konzentrierten Aufschwemmung	Beginn der Färbung bei der jüngeren verdünnten Aufschwemmung	Temperatur	Beginn der Färbung bei der älteren konzentrierten Aufschwemmung	Beginn der Färbung bei der jüngeren verdünnten Aufschwemmung
0°	35′	82′	35°	1′ 50″	5′
5	22′	59′	40	1′ 25″	3′ 25″
10	15′ 30″	41′	45	55″	2′ 35″
15	9′	23′	50	30″	1′ 50″
20	6′	14′	55	18″	1′ 20″
25	3′ 45″	10′ 30″	60	10″	30″
30	2′ 30″	7′	65	—	—

Bis zur Temperatur von 60° beobachtete man eine Verstärkung des nach den in der Tabelle angegebenen Zeiten zuerst auftretenden rosa Farbtones, bei 65° trat im Augenblick des Zufließens der Bakterienaufschwemmung eine ganz schwache Rosafärbung auf, die dann aber sofort wieder verschwand; gegen die Kontrolle zeigte diese Mischung eine kaum merkliche Dunkelfärbung und blieb nach mehrstündigem Stehen bei dieser Temperatur unverändert.

Die erhaltenen Daten sind für die Temperaturen bis 65° in Kurven graphisch zur Darstellung gebracht worden.

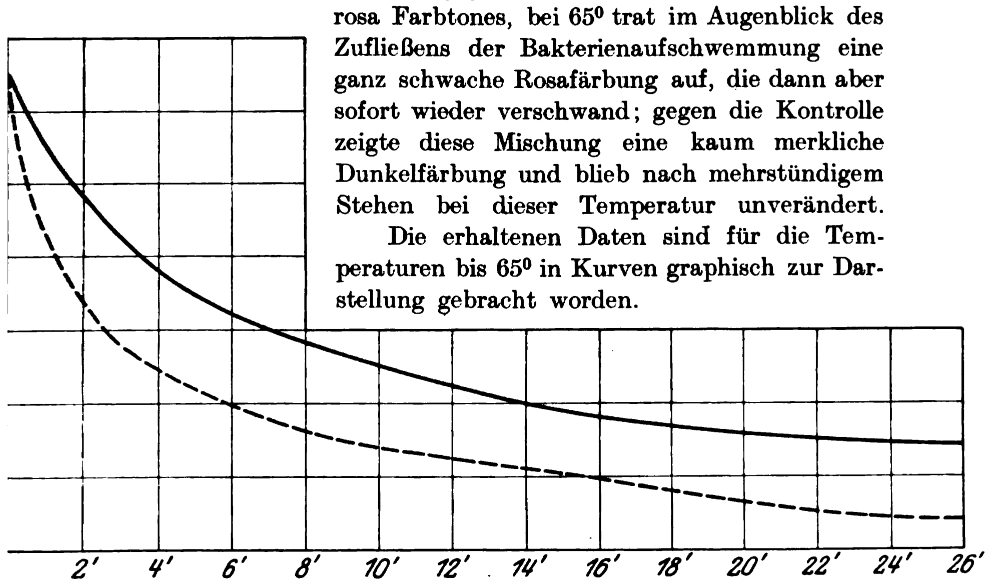


Abb. 1. Einfluß der Temperatur auf die Reaktionsgeschwindigkeit der Bakterientyrosinase.
——— Verdünntere Aufschwemmung. — — — Konzentriertere Aufschwemmung.

Man erkennt daraus, wie groß einerseits der Temperatureinfluß, andererseits die Konzentration der Bakterienkultur auf die Reaktionsgeschwindigkeit des Fermentes ist. Bemerkenswert erscheint es hierbei, daß die Geschwindigkeit des Reaktionseintritts mit der Temperaturerhöhung ständig zunimmt und das Optimum fast mit der Inaktivierungstemperatur zusammenfällt, während die Fermentaktivität, gemessen an den Umsatzmengen, bekanntlich bei allen Fermenten bis zu einer optimalen Temperatur steigt und dann *allmählich absinkt*, um bei einer oberen Temperaturgrenze zu erlöschen.

Bestimmung der Kardinalpunkte der Wasserstoffionenkonzentration für die Wirksamkeit von Bakterientyrosinase.

Ausgeführt wurden diese Bestimmungen bei Zimmertemperatur in Reagenzgläsern, die jeweils insgesamt 10 ccm Flüssigkeit enthielten. Als Bakterienmaterial diente eine Aufschwemmung von 6 Tage alten Sojabakterienkulturen mit Chloroformzusatz. Beim ersten Versuche wurde mittels Gemischen von primärem und sekundärem Phosphat nach *Sörensen* in 12 Röhrchen eine p_H-Reihe hergestellt, die etwa von $p_H = 5{,}6$ bis $p_H = 8{,}7$ hinabreichte.

Die Veränderungen in der Wasserstoffionenkonzentration, die durch Zusatz der schleimigen Bakterienaufschwemmung und die geringen Mengen des vorhandenen Tyrosins etwa hervorgerufen waren, wurden außer Betracht gelassen, da zu genauen elektrometrischen Messungen die notwendige Apparatur fehlte. Es sei deshalb auch ausdrücklich betont, daß die erhaltenen Werte durchaus nicht als genau gelten können, sondern nur als angenäherte angesehen werden dürfen.

Die Phosphate als solche scheinen einen stark hemmenden Einfluß auf die Tyrosinase auszuüben, denn eine Färbung war im günstigsten Falle erst nach mehr als zehnstündigem Stehen bei Zimmertemperatur wahrnehmbar, und die Beobachtungen mußten sich über einen Zeitraum von etwa 72 bis 96 Stunden erstrecken.

Auffallend war, daß die ersten Verfärbungen nicht in den Mischungen auftraten, deren Wasserstoffionenkonzentration um den Neutralpunkt herumlagen, sondern in denen, die deutlich saure und deutlich alkalische Reaktion besaßen. Nach 20 Stunden zeigte sich in den Röhrchen mit einer Wasserstoffionenkonzentration von $10^{-5{,}6}$ bis $10^{-6{,}2}$ eine schwache Rotbraunfärbung und ebenso, wenn auch schwächer, auf der alkalischen Seite bei der Wasserstoffionenkonzentration von $10^{-8{,}0}$ bis $10^{-8{,}7}$. Daraus wäre zu schließen, wenn man die Phosphatwirkung als solche unberücksichtigt ließe, daß sowohl eine saure wie eine alkalische Reaktion, gegenüber der neutralen, in gewissen Grenzen die Fermentwirkung beschleunigt.

Nach 28 Stunden begann auch Nr. 10 ($p_H = 7{,}70$) sich schwach zu verfärben. Nach 40 Stunden war Nr. 11 ($p_H = 8{,}04$) am stärksten rotbraun gefärbt, dann nahm die Färbung ab, sowohl in 12 ($p_H = 8{,}7$), wie in 10 ($p_H = 7{,}7$) und 9 ($p_H = 7{,}4$). Nr. 8 bis 4 ($p_H = 7{,}15$ bis $6{,}5$) waren ungefärbt, Nr. 3 bis 1 ($p_H = 6{,}2$ bis $5{,}6$) schwach gefärbt. Nach 60 Stunden zeigte auch Nr. 8 ($p_H = 7{,}15$) und Nr. 4 ($p_H = 6{,}5$) schwache Oxydation. Nach 4 Tagen war das Resultat folgendes: Stärkste Färbung, also größte Wirksamkeit war bei $p_H = 8$ zu beobachten, bei $p_H = 8{,}7$ war die Färbung etwas schwächer und schwach war sie bei $p_H = 5{,}6$. Das Optimum lag demnach bei etwa $p_H = 8$, die Maxima jenseits $p_H = 8{,}7$ und $p_H = 5{,}6$.

Zur Erzielung höherer Alkalität wurden als Pufferlösungen Glykokoll-Natriumhydroxyd-Gemische angewandt und in sieben Röhrchen Lösungen mit Wasserstoffionenkonzentrationen von $10^{-7,8}$ bis $10^{-11,3}$ verteilt. Ebenso wie bei dem Phosphat trat auch bei diesem Gemisch eine starke Verzögerung der Oxydation zutage. Nach 24 Stunden war noch keine Färbung zu bemerken. Nach 72 Stunden waren Nr. 1 ($p_H = 7,8$) und Nr. 2 ($p_H = 8,4$) etwa gleich stark gefärbt, Nr. 3 und 4 ($p_H = 8,9$ bis 9,3) waren in der Färbung ebenfalls ziemlich gleichmäßig, aber schwächer, dann wurde die Färbung noch schwächer in Nr. 5 ($p_H = 9,7$), im nächsten Röhrchen war nur eine äußerst geringe Oxydation eingetreten und bei Nr. 7 ($p_H \doteq 10,5$) überhaupt keine Verfärbung mehr wahrnehmbar. Demnach lag auch bei diesen Versuchen das Optimum der Wasserstoffionenkonzentration um 10^{-8} herum; das Maximum lag zwischen $10^{-10,0}$ und $10^{-10,5}$.

Es wurde schließlich weiter eine p_H-Reihe nach *Sörensen* angesetzt, die bereits mit einer Wasserstoffionenkonzentration von etwa $10^{-5,0}$ begann und bis zu einer solchen von $10^{-12,5}$ hinabreichte. Als Puffer dienten dabei folgende Mischungen: Natriumhydroxyd + Zitrat, primäres + sekundäres Phosphat, Salzsäure + Borat, Natriumhydroxyd + Borat und Natriumhydroxyd + Glykokoll.

Nach 24stündigem Stehen waren außer der Kontrolle die Röhrchen mit der Wasserstoffionenkonzentration von $10^{-5,5}$ bis $10^{-6,5}$ deutlich rosa gefärbt und etwas schwächer die mit der Konzentration von $10^{-8,0}$ bis $10^{-8,5}$. Nach 3 Tagen wurde bei $p_H = 5,0$ eine äußerst schwache kaum erkennbare Rosafärbung festgestellt; es schien hier die Grenzkonzentration der Wasserstoffionen für die Tyrosinasewirksamkeit erreicht zu sein. Von da stieg die Intensität der Färbung an. Stärkste Oxydationswirkung war bei $p_H = 8,0$ wahrnehmbar, von da gleichmäßig abfallend bis zu $p_H = 10,0$. In den Röhrchen Nr. 16 bis 20 ($p_H = 10,5$ bis 12,5) war keine Veränderung eingetreten.

Die Beobachtungen in dieser Reihe stimmten mit denen der ersten überein. In beiden Fällen war eine Reaktionsbeschleunigung sowohl auf der sauren, und zwar auf dieser noch etwas stärker als auf der alkalischen Seite, festzustellen gegenüber den Mischungen, deren Wasserstoffionenkonzentrationen im oder in der Nähe des Neutralpunktes lagen. Trotzdem zeigten beide Versuche, daß das Optimum für die Wirksamkeit (nicht die Reaktionsgeschwindigkeit!) auf der alkalischen Seite liegt. Das Maximum dieser Seite war übereinstimmend bei beiden Versuchsreihen, einmal mit den Puffergemischen Glykokoll + Natriumhydroxyd, und einmal mit der Pufferung Borat + Natriumhydroxyd bei einer Wasserstoffionenkonzentration zwischen $10^{-10,0}$ und $10^{-10,5}$ gefunden worden.

Wenn die angegebenen Zahlen auch nur bedingte Geltung haben, da die Pufferlösungen an sich das Ferment stark beeinflussen und, wie gesagt, die wahrscheinlichen Veränderungen der Wasserstoffionenkonzentration durch die Aufschwemmung selbst nicht berücksichtigt sind, so ist doch daraus ohne weiteres zu erkennen, daß die Wirkungsbreite der Bakterientyrosinase innerhalb weiter Grenzen liegt. Unter den obigen Versuchsbedingungen waren die Grenzkonzentrationen der Wasserstoffionen einerseits etwa 10^{-5} und andererseits etwa $10^{-10,0}$ bis $10^{-10,5}$, das Optimum etwa 10^{-8}.

Bestimmung der Empfindlichkeitsgrenze der Bakterientyrosinasereaktion.

Es galt hier festzustellen:

a) Welche kleinsten Mengen von tyrosinasehaltigem Bakterienmaterial genügen, um Tyrosin in wässeriger Lösung noch zu oxydieren?

b) Bei welcher Verdünnung ist Tyrosin durch Bakterientyrosinase noch nachweisbar?

Um die kleinste Menge von Bakterienmaterial zu finden, die in einer Tyrosinlösung eine eben noch sichtbare Färbung hervorzurufen imstande ist, wurde in einer Serie Reagenzgläser je 1 ccm einer gesättigten wässerigen Lösung von Tyrosin eingefüllt und steigend $^1/_8$, $^1/_4$, $^1/_2$, 1, 2, 3, 4, 5 usw. Ösen voll Material, das von einer zehntägigen Sojabakterienkultur auf Möhrenagar stammte, sowie je einige Tropfen Chloroform zugefügt, kräftig durchgeschüttelt und ins Wasserbad von 40° gestellt. Die Röhrchen mit $^1/_8$ und $^1/_4$ Öse Bakterienmaterial blieben farblos, beim dritten Röhrchen mit $^1/_2$ Öse war eine schwache Rosafärbung, beim vierten mit einer Öse voll eine deutliche Rosafärbung zu sehen. In der Skala aufwärts war entsprechend der Bakterienmenge die Färbung stets intensiver und mit der Zunahme der Bakterienmenge hatte auch die Reaktionsgeschwindigkeit zugenommen.

Von dem gleichen Bakterienmaterial wurde eine bestimmte Anzahl von Ösen in ein gewogenes Porzellanschälchen abgestrichen und das Schälchen mit Inhalt, nach dem Trocknen im Exsikkator, über Schwefelsäure gewogen. So war genau festzustellen, wieviel exsikkatortrockene Bakterienmasse einer Öse Frischmasse entsprach.

In unserem Falle war es so möglich gewesen, mit Hilfe von einer 0,000 25 g Trockenmasse entsprechenden Bakterienmenge in 1 ccm Flüssigkeit das Tyrosin noch sichtbar zu oxydieren.

Bei Prüfungen von Sojabakterien auf ihr Vermögen, verschiedene Aminosäuren als Stickstoffquelle verwerten zu können, wurde in der Versuchsreihe bei den mit *Leucin*zusatz hergestellten Nährböden eine deutliche, wenn auch schwache Dunkelfärbung des Substrates durch die Bakterien beobachtet. Die Erklärung für diese Erscheinung brachte die chemische Untersuchung des angewandten Leucins; dasselbe war

mit Tyrosin verunreinigt und diese Verunreinigung war auf biologischem Wege kenntlich geworden. Danach sind also sehr geringe Mengen von Tyrosin auf diese Weise nachweisbar.

Zur genauen Bestimmung der Empfindlichkeitsgrenze wurden als Bakterienmaterial Sojabakterien und von den Tyrosinen das aus Horn hergestellte Präparat angewandt. In der Gesamtflüssigkeitsmenge war das Tyrosin in folgenden Konzentrationen enthalten:

	Ausfall der Reaktion		Ausfall der Reaktion
1. 0,2 Proz. Tyrosin . . .	+	6. 0,005 Proz. Tyrosin .	+
2. 0,1 „ „ . . .	+	7. 0,0025 „ „ .	±
3. 0,05 „ „ . . .	+	8. 0,001 „ „ .	—
4. 0,025 „ „ . . .	+	9. 0,0005 „ „ .	—
5. 0,01 „ „	+	10. 0,00025 „ „ .	—

Bei wiederholten Prüfungen erwiesen sich 0,005 Proz. noch stets nachweisbar, dagegen fiel das Resultat bei 0,0025 Proz. Tyrosin wechselnd aus. Bei einem Gehalt von 0,001 Proz. war selbst nach 48 Stunden keine Färbung sichtbar.

Das angewandte Tyrosin war also in einer Verdünnung von 1 : 20000 bis 1 : 40000 durch Bakterientyrosinase noch nachzuweisen.

Die Reaktionsgeschwindigkeit der Bakterientyrosinase nahm mit der Konzentrationsverminderung des Tyrosins ab. Demnach gilt für die Bakterientyrosinase das gleiche Wirkungsgesetz, wie es *Bach* (20) für die Pilztyrosinase fand.

Die Aufspaltung des Tyrosins durch Tyrosinase.

Über die enzymatische Oxydation des Tyrosins weiß man nur, daß sie unter Ammoniak- und Kohlendioxydabspaltung, sowie unter Aufnahme von Sauerstoff verläuft und mit der Bildung dunkel gefärbter Produkte, der sogenannten Melanine, endet. Die Frage, welche Zwischenprodukte bei dem oxydativen Prozeß entstehen, ist noch nicht geklärt.

Czapek (21) hält die zuerst von *Gonnermann* ausgesprochene Vermutung, daß zunächst Homogentisinsäure aus Tyrosin entstände, für durchaus wahrscheinlich und weist auf die als Alkaptonurie bezeichnete Stoffwechselanomalie des Menschen hin, bei der das verabreichte Tyrosin nach *Baumann* und *Wolkow* als Homogentisinsäure im Harn wiedererscheint, ein Vorgang, der in der Tyrosinasewirkung ein Seitenstück besitzen soll.

$$HO\text{-}C_6H_4\text{-}CH_2CHNH_2.COOH + 3O = (HO)_2C_6H_3\text{-}CH_2.COOH + NH_3 + CO_2$$

Auch *Beijerinck* macht diese Anschauung zu der seinen. Auf die Desaminierung des Tyrosins als primärem Vorgang soll dann sekundär

die Überführung in Melanin folgen. *Bach* (22) legt der Tyrosinasewirkung den hydroklastischen Abbau der Aminosäuren im Sinne der *Strecker*schen Reaktion zugrunde:

$$\mathrm{HO{-}C_6H_4{-}CH_2CHNH_2.COOH} + 3H_2O + A = \mathrm{HO{-}C_6H_4{-}CH_2CH(OH)_2} + NH_3 + CO(OH)_2 + AH_2$$

A = Acceptor für Wasserstoff

Darnach entsteht nicht Homogentisinsäure, sondern p-Oxyphenylacetaldehyd neben Kohlensäure und Ammoniak.

Wenn der Tyrosinabbau über den p-Oxyphenylacetaldehyd vor sich ginge, so müßte dieses Intermediärprodukt auch als solches durch Tyrosinase angreifbar sein und in dunkel gefärbte Oxydationsprodukte übergeführt werden können, wie das für die Homogentisinsäure bekannt ist. Die Prüfung konnte aber bisher wegen der schweren Zugänglichkeit des aromatischen Aldehyds nicht durchgeführt werden. Von einer Untersuchung der Bakterienkulturlösungen auf eine derartige Bildung von p-Oxyphenylacetaldehyd aus dem zugesetzten Tyrosin wurde deswegen Abstand genommen, weil bei der Einwirkung starker tyrosinasehaltiger Bakterienaufschwemmungen auf Phenylglykokoll — aus dem nach *Chodat* und *Schweizer* (23) durch die Tyrosinase, analog wie bei Tyrosin, der um ein Kohlenstoffatom ärmere Aldehyd abgespalten werden soll — der zu erwartende Benzaldehyd nicht nachgewiesen werden konnte, obwohl Spuren dieses Körpers genügen, um deutlich und einwandfrei durch den Geruch kenntlich zu werden, und es spezifische Reaktionen derartiger oder noch größerer Schärfe für den Oxyphenylacetaldehyd bisher nicht gibt.

Dagegen wurde versucht, das vorübergehende Vorhandensein von Homogentisinsäure in den flüssigen tyrosinhaltigen Bakterienkulturen chemisch nachzuweisen, da wir sehr empfindliche Reaktionen für diese Säure kennen und ein Erfolg — die Richtigkeit der älteren Theorie vorausgesetzt — wenigstens in diesem Falle nicht von vornherein aussichtslos erschien. Es wurde dabei ausgegangen von Möhrenauszug und Mannit-Salzlösungen mit einem Tyrosinzusatz von 0,15 Proz., die zu je 100 ccm in 750-ccm-Erlenmeyerkolben gefüllt, mit jungem Kulturmaterial von *Soja-hispida*-Bakterien beimpft und bei 29° bebrütet wurden. Die Knöllchenbakterien wuchsen gut in diesen Kulturflüssigkeiten, und nach 8 bis 14 Tagen waren die Nährmedien dunkelbraun bis braunschwarz gefärbt, zuweilen zeigten sie auch einen schwärzlichen Bodensatz. Am 3., 5., 7., 9., 12., 15., 18., 22. und 28. Tage wurde je eine Serie der Erlenmeyerkolben aus dem Thermostaten herausgenommen, jedem Kulturgefäß 20 ccm 5proz. Schwefelsäure zugesetzt und dann folgendermaßen weiterbehandelt:

Die angesäuerte Kulturflüssigkeit wurde filtriert, das klare Filtrat mit Äther mehrmals ausgeschüttelt, von den vereinigten ätherischen Auszügen der Äther verdunstet und der Rückstand mit etwa 5 ccm Wasser aufgenommen. Die hierbei resultierende farblose bis schwach gelblich gefärbte Lösung wurde nach *Wolkow* und *Baumann* (24) und *Schulze* und *Castaro* (25) auf Homogentisinsäure geprüft. Alle Reaktionen, von denen einzelne so empfindlich sind, daß selbst Bruchteile eines Milligramms von Homogentisinsäure durch sie sicher nachweisbar sind, fielen in sämtlichen Serien negativ aus.

In einigen Versuchen wurde auch der von Äther befreite Rückstand mit wenig Alkohol in der Wärme behandelt und in die abgekühlte alkoholische Lösung Salzsäure in Gasform eingeleitet. Nach 24stündigem Stehen wurde mit Wasser verdünnt, mit Soda übersättigt und mit Äther ausgeschüttelt. Aus dem Rückstande des Ätherauszuges sollen sich beim Erkalten Kristalle von Homogentisinsäureäthylester abscheiden, der die gleichen reduzierenden Reaktionen geben soll, wie die Homogentisinsäure. Auch diese Prüfungen verliefen resultatlos. Deshalb die intermediäre Bildung von Homogentisinsäure zu bestreiten, geht nicht an. Es wäre wohl möglich, daß die Homogentisinsäure im Augenblick ihres Entstehens weiteroxydiert wird. Wie es unter gewissen Umständen unmöglich ist, bei der Reduktion von Nitraten durch Bakterien das intermediär gebildete Nitrit nachzuweisen, so könnte sich auch hier die Homogentisinsäure dem chemischen Nachweis entziehen. Nun gelingt es zuweilen aber, durch Verlangsamung des Reduktionsprozesses beim Nitrat die vorübergehende Anwesenheit des Nitrits doch festzustellen. Eine unter Zugrundelegung dieser Erwägung absichtlich durch Aufstellung der Kulturgefäße bei niedrigerer Temperatur herbeigeführte Verzögerung der oxydativen Umsetzungen des Tyrosins war aber ebenfalls ohne Erfolg, Homogentisinsäure war auch unter diesen Umständen nicht nachzuweisen.

Nimmt man trotzdem an, daß der Tyrosinabbau über die Homogentisinsäure führt, so wäre dieser Vorgang unter Berücksichtigung der „Zwei-Enzymtheorie", die von *Bach* (22) aufgestellt und von *Beijerinck* (26) und *Wieland* (27) gestützt, von *Chodat* und *Schweizer* (28) aber bestritten wird, bemerkenswert, denn die zwei verschiedenen Enzyme, die an der oxydativen Spaltung des Tyrosins beteiligt sein sollen, müßten demnach so aufeinander abgestimmt sein, daß das von dem einen Enzym gebildete Produkt mit derselben Geschwindigkeit, mit der es entsteht, von dem zweiten weiter oxydiert würde.

Zusammenfassung.

1. Tyrosinase ist in den Knöllchenbakterien von *Soja hispida, Lupinus, Genista tinctoria, Sarothamnus scoparius, Coronilla varia* und *Tetragonolobus purpureus* enthalten.

Welcher Wert der Auffindung der Tyrosinase bei den Reinkulturen dieser Knöllchenbakterien beizumessen ist und wieweit die Tyrosinasereaktion als Differentialdiagnostikum im Rahmen der einleitend dargelegten Aufgabe brauchbar erscheint, darüber soll später im Zusammenhang mit anderen in Gang befindlichen ausgedehnteren Untersuchungen berichtet werden.

2. Die Tyrosinase dieser Bakterien zeigte im allgemeinen große Übereinstimmung mit der von *Abderhalden* und *Guggenheim* aus Russula delica gewonnenen Pilztyrosinase.

3. Tyrosine verschiedener Herkunft verhielten sich optisch verschieden und zeigten auch in ihrer Oxydierbarkeit durch Bakterientyrosinase Verschiedenheiten.

4. Aus Tyrosin hergestelltes tyrosinsulfosaures Barium wurde durch Bakterientyrosinase schwerer oxydiert als Tyrosin selbst. Oxyphenyläthylamin war am besten als salzsaure Base oxydierbar. Schwach oxydiert wurde die 2:4-Dioxybenzoesäure (= β-Resorcylsäure), nicht oxydiert die 2:5-Dioxybenzoesäure (= Gentisinsäure), die 2:4- und 2:5-Dinitrobenzoesäure, ferner die Ortho-Amidobenzoesäure und Phenylglykolsäure.

5. Die Bakterientyrosinase ist ein Endoenzym, dessen Wirksamkeit nicht vom lebenden Plasma abhängt. Sie ist auch in toten Bakterienkulturen noch wirksam, doch ist die Art des Abtötens der Bakterienzellen von wesentlicher Bedeutung für die Erhaltung der Fermentaktivität.

Tonzellfiltrate enthalten keine wirksame Tyrosinase.

6. Die Inaktivierungstemperatur für die Bakterientyrosinase liegt bei frisch isolierten Stämmen zwischen 60 und 65° C. Durch längeres Fortzüchten der Bakterienkulturen auf Agarnährböden kann die Resistenz der Enzyme gegen Hitze geringer werden.

Der Vorgang der Inaktivierung der Bakterientyrosinase durch Erhitzung auf 65 bis 70° C ist ein reversibler.

7. Die Geschwindigkeit des Reaktionseintritts der Tyrosinoxydation nimmt mit steigender Temperatur zu; sie wird um so größer, je näher sich die Temperatur der Inaktivierungstemperatur der Tyrosinase nähert.

8. Die Wirksamkeitsbreite für Bakterientyrosinase liegt bei Verwendung von Pufferlösungen etwa zwischen $p_H = 5$ und $p_H = 10,5$, das Optimum der Aktivität etwa bei $p_H = 8$.

9. Es genügte eine 0,00025 g Sojabakterientrockenmasse entsprechende Menge Bakterienfrischmasse, um in 1 ccm Flüssigkeit das Tyrosin noch sichtbar zu oxydieren.

10. Mit Hilfe von Bakterientyrosinase ließen sich noch 0,005 Proz. Tyrosin sicher zum Nachweis bringen.

11. Es war nicht möglich, Homogentisinsäure als Zwischenprodukt bei der Aufspaltung des Tyrosins durch Bakterientyrosinase chemisch nachzuweisen.

Literatur.

1) *C. Gessard*, Annal. de l'Inst. Pasteur **15**, 817, 1901. — 2) *K. B. Lehmann*, Münch. med. Wochenschr., Jahrg. 49, S. 340, 1902. — 3) *D. Carbone*, Zentralbl. f. Bakt., Abt. II, **19**, 587, 1907. — 4) *Y. Uyeda*, Chem. Zentralbl. 1906, **1**, 1757, 77. Jahrg. — 5) *K. B. Lehmann* und *Sano*, Arch. f. Hyg. **67**, 99, 1908. — 6) *M. W. Beijerinck*, Kon. Akad. van Wetensch. Amsterdam **18**, 1066, 1911. — 7) *Otto Appel*, Arb. aus der Kais. biol. Reichsanstalt für Land- und Forstwirtsch. 8, 451, 1913. — 8) *Fr. Fuhrmann*, Vorlesungen über Bakterienenzyme, Jena 1907. — 9) *Anna Muschel*, diese Zeitschr. **131**, 570, 1922. — 10) *A. Maassen* und *Müller*, Ber. über die Tätigkeit der Kaiserl. biol. Anst. f. Land- und Forstw. im Jahre 1906, S. 42. — 11) *J. Simon*, Jahresber. d. Vereinig. f. d. angew. Botanik, 5. Jahrg., 1907, S. 132. — 12) *M. Klimmer* und *R. Krüger*, Zentralbl. f. Bakt., II. Abt., **40**, 256, 1914. — 13) *J. Vogel* und *Zipfel*, ebendaselbst **54**, 13, 1921. — 14) *E. Abderhalden* und *M. Guggenheim*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **54**, 331, 1907/08. — 15) *M. W. Beijerinck*, Chem. Weekblad, 16. Jahrg., 1919, S. 1494. — 16) *R. Schmitt* und *O. Nasse*, Ann. d. Chem. u. Pharm. **133**, 211, 1865. — 17) *Gabr. Bertrand*, Ann. de l'Inst. Pasteur. **22**, 381, 1908. — 18) *C. Bertrand* und *M. Rosenblatt*, C. r. **150**, 1142, 1910; Ann. de l'Inst. Pasteur **24**, 653, 1910. — 19) *W. M. Bayliss*, Enzyme als Kolloide. Die Naturwissenschaften. 10. Jahrg., 1922, H. 46, S. 983. — 20) *A. Bach*, Ber. d. deutsch. chem. Ges. **41**, 221, 1908. — 21) *Fr. Czapek*, Biochem. d. Pflanzen. Jena 1921. — 22) *A. Bach*, diese Zeitschr. **60**, 221, 1914. — 23) *R. Chodat* und *K. Schweizer*, Arch. des scienc. phys. et naturelles, 120. Jahrg., S. 331, Genève 1915. — 24) *M. Wolkow* und *E. Baumann*, Zeitschr. f. phys. Chem. **15**, 228, 1891. — 25) *E. Schulze* und *N. Castaro*, ebendaselbst **48**, 396, 1906. — 26) *M. W. Beijerinck*, Kon. Acad. van Wetensch. Amsterdam **15**, 932, 1913. — 27) *H. Wieland*, Ber. d. deutsch. chem. Ges. **46**, 3327, 1913. — 28) *R. Chodat* und *K. Schweizer*, Arch. des scienc. phys. et natur., 120. Jahrg., 1915, S. 327.

Die Rolle der Bakterien bei der „Milchsäuregärung der Glucose durch Peptone“[1]. II.

Von

Oskar Acklin.

(Aus dem hygienisch-bakteriologischen Institut der eidgenössischen Technischen Hochschule in Zürich.)

(Eingegangen am 7. Juli 1923.)

In der ersten Mitteilung[2]) wurde festgestellt, daß überall da, wo in den *Schlatter*schen Gärversuchen Gas gebildet wird, gleichzeitig regelmäßig Bakterien anwesend sind. Es erschien daher angezeigt, diese Bakterien näher kennenzulernen, insbesondere deren Lebenseigentümlichkeiten.

In der vorliegenden zweiten Mitteilung: „Die Bakterien“, gelangen wir hierüber zu folgenden Feststellungen:

A. Die Bakterien der Komponenten der Gärsysteme.

Unter Berücksichtigung völliger Sterilität wurden von den drei Komponenten: a) Natriumbicarbonat, b) Glucose und c) Pepton je abgestufte Mengen in 50 ccm Bouillon eingetragen und bei 22 und 37° bebrütet.

a) Natriumbicarbonat.

Es wurden Proben mit je 0,025, 0,05, 0,1, 0,5 und 1,0 g $NaHCO_3$ angelegt, bei 22° bis zum sechsten Tage und bei 37° bis zum dritten Tage bebrütet und beobachtet.

Resultat: Alle Proben blieben steril!

b) Glucose.

Es wurden Proben von je 0,05, 0,1, 0,5, 1,0, 1,5 und 2,0 g Glucose bei 22° bis zum sechsten Tage und bei 37° bis zum dritten Tage bebrütet und beobachtet.

Resultat: Alle Proben blieben steril.

Die Sterilitätsproben mit $NaHCO_3$ und Glucose sind gelegentlich wiederholt worden und haben bis heute immer dasselbe Resultat gezeitigt.

---

[1]) Milchsäuregärung der Glucose durch Peptone, von *Gottfried Schlatter* (aus dem physikalisch-chemischen Institut der eidgenössischen Technischen Hochschule Zürich). Diese Zeitschr. **131**, 362, 1922.

[2]) Diese Zeitschr. **139**, 457. 1923.

c) Pepton.

Es wurden Proben von je 0,1, 0,2, 0,5, 1,0, 1,5 und 2,0 g der verschiedenen Peptone bei 22° bis zum sechsten Tage und bei 37° bis zum dritten Tage bebrütet und beobachtet.

Bakterienwachstum bei:

	22° (6. Tag)					37° (3. Tag)					
Peptone	0,1	0,2	0,5	1,0	2,0 g	0,1	0,2	0,5	1,0	1,5	2,0 g
I_0	—	+	++	++	++	—	—	+	++	++	++
IV	—	—	—	+	++	—	—	—	+	+	+
V_0	+	+	+	++	++	—	+	+	++	++	++
VI_0	—	—	—	+	+	—	—	—	—	+	+
VII	—	—	+	+	+	—	—	—	+	+	+
VIII	—	—	—	+	+	—	—	—	—	+	+

+ = wenig Bakterien.
++ = deutliches Bakterienwachstum.

Obige Versuchsreihe wurde dreimal wiederholt, und dabei konnten jeweils merkliche Schwankungen in den Resultaten der einzelnen Reihen der gleichen Peptone beobachtet werden, woraus hervorgehen dürfte, daß die Verteilung der Bakterien in den Peptonen *keine* gleichmäßige sein kann!

Es wurde trotzdem versucht, mit Hilfe des Plattenverfahrens auf Traubenzuckeragar die Bakterien der Peptone zahlenmäßig zu bestimmen. Die zahlenmäßige Bestimmung der Bakterien ergab sehr große Ungleichheiten, womit die vorgängig gemachte Beobachtung bestätigt wurde, daß eine ungleichmäßige Verteilung der Bakterien in den Peptonen vorliegt.

Die maximalen Werte, die bei den folgenden drei Peptonen ermittelt worden sind — wobei diesen Zahlen jedoch keine endgültige Bedeutung beizulegen ist — seien hier angeführt:

Pepton	I_0	enthielt	50	Bakterien	pro	Gramm.
,,	I	,,	25	,,	,,	,,
,,	V_0	,,	200	,,	,,	,,
,,	V	,,	150	,,	,,	,,

Es wurden nunmehr wiederum mit Hilfe des Plattenverfahrens die Bakterien der verschiedenen Peptone auf Traubenzuckeragar bei 37° isoliert und folgende Stämme festgestellt (s. Tabelle S. 72).

Die chemische Herstellungsart und wohl auch für die vorliegenden Verhältnisse ein glücklicher Zufall lassen sowohl das Natriumbicarbonat als auch die Glucose steril erscheinen, so daß das Pepton allein als Träger der Bakterien in Frage kommt, welche dann auch ohne Ausnahme in jedem der untersuchten Peptone vorgefunden worden sind.

Die Bakterien des Peptons finden sich entsprechend den Beobachtungen in der ersten Mitteilung in den verschiedenen Peptonen in

Bakterienstämme der Peptone	Gramfärbung	Morphologische Eigenschaften	Saccharolyt. Ferment bei 37° aus: Glucose, Säurebildend nach	Glucose, Gasbildend nach	Lactose, Milch gerinnend nach	Proteolytisches Ferment bei 22° Gelatine verflüssigt nach	Wachstum in Bouillon bei 37°	Wachstum auf Schrägagar bei 37° (Farbstoffbildung)
I_O Nr. 1	+	Kokken, rundlich oval, i. Ketten u. Trauben	16 Std.	—	19 Std.	—	Bodenkuppe	—
„ 2	+	Kleine Staphylokokken	16 Std.	—	17 Std.	12 Tg.	schwache diffuse Trübung und Bodensatz	goldgelb
„ 3	+	Sarcine	—	—	—	—	schwache diffuse Trübung und Bodensatz	schwefelgelb
„ 4	+	Stäbchen beweglich, schlank bis kurz, ovale Sporen	14 Std.	—	4 Tg. [1])	3 Tg.	kräftige Kahmhaut	grauweiß
I „ 1	+	Sarcine	±	—	—	12 Tg.	klar, krümeliger Bodensatz	schwefel- bis citronengelb
„ 2	+	Kokken, rundlich oval, i. Ketten u. Trauben	16 Std.	—	—	—	Bodenkuppe	—
IV „ 1	+	Stäbchen meist als Fäden, Sporen	—	—	5 Tg.	10 Tg.	laichartiger Bodensatz	—
„ 2	+	Kokken klein, oval, Semmelform	36 Std.	—	—	—	klar, schleimig zäher Bodensatz	grauweiß
V_O „ 1	—	Stäbchen kurz, plump, verschieden lang	16 Std.	16 Std.	24 Std.	—	diffuse Trübung und schleimiger Bodensatz	—
„ 2	+	Stäbchen kurz, gelegentlich Fadenbildung, Sporen	36 Std.	—	4 Tg.	4 Tg.	diffuse Trübung	grauweiß
„ 3	+	Kokken klein, Trauben, auch ganz kurze Ketten	—	—	—	—	diffuse Trübung	grauweiß
„ 4	+	Sarcine	—	—	—	—	schwache diffuse Trübung und Bodensatz	schwefelgelb
„ 5	+	Kokken groß, oval	—	—	—	—	diff. Trübung u. flock. Bodensatz	—
„ 6	+	Kokken klein, Trauben	—	—	30 Tg. (?)	20 Tg.	schlieriger Bodensatz	grauweiß
„ 7	+	Kokken groß	36 Std.	—	30 Tg. (?)	—	Bodenkuppe	—
„ 8	+	Kokken unregelmäßig	3 Tg.	—	—	4 Tg.	diffuse Trübung und Bodensatz	goldgelb
V „ 1	+	Kokken klein, Trauben kurze Ketten	—	—	—	—	schwache Trübung und schwacher Bodensatz	—
„ 2	+	Stäbchen kurz, gelegentlich Fadenbildung, Sporen	48 Std.	30 Std.	5 Tg.	4 Tg.	klar mit weißer Kahmhaut	graubraun
„ 3	+	Staphylokokken klein	16 Std.	—	—	4 Tg.	diff. Trübung u. zäher Bodensatz	orange
„ 4	+	Stäbchen groß	3 Tg.	—	—	4 Tg.	klar, zäher Bodensatz	grauweiß
VI „ 1	+	Stäbchen groß	36 Std.	—	—	10 Tg.	diff. Trübung u. weicher Bodensatz	gelbweiß
„ 2	+	Kokken groß	48 Std.	—	—	—	diffuse Trübung	deckweiß
VII „ 1	+	Kokken klein, Trauben und kurze Ketten	48 Std.	—	2 Tg.	14 Tg.	stark diff. Trübung u. Bodensatz	deckweiß
VIII „ 1	+	Kokken groß	—	—	—	—	diffuse Trübung und Bodensatz	grauweiß
IX „ 1	+	Stäbchen kräftig, plump, fadenbildend	16 Std.	—	24 Std.	16 Tg.	diffuse Trübung	gelbweiß
„ 2	+	Kokken klein, Trauben und kurze Ketten	48 Std.	—	2 Tg.	14 Tg.	diff. starke Trübung u. Bodensatz	deckweiß
„ 3	+	Stäbchen beweglich, schlank, fadenbildend, Sporen oval	—	—	4 Tg.	7 Tg.	starke, feinflockige Trübung	—
„ 4	+	Kokken klein, oval, gelegentl. krz. Ketten	—	—	—	—	diffuse Trübung	deckweiß

1) Keine Säuregerinnung! (p_H = 7,2 bis 7,4.)

ganz verschiedenen Mengen vor. Dies dürfte sich aus der kleinen Tabelle S. 71 ohne weiteres ergeben, trotzdem sie keine absoluten Zahlen über den Bakteriengehalt enthält.

Das Pepton sic. cum sale „Siegfried"-Original enthielt demgemäß im April 1922 in 0,2 g bei 22⁰ Bakterien, während Bakterienwachstum bei 37⁰ erst in 0,5 g Pepton festgestellt werden konnte.

Das Pepton sic. e carne dagegen enthielt erst in 1,0 g, sowohl bei 22⁰ als auch bei 37⁰ Bakterien.

Das Pepton „Witte"-Original enthielt bereits in 0,1 g bei 22⁰ und in 0,2 g bei 37⁰ Bakterien.

Das Pepton „Merck"-Original wies bei 22⁰ in 1,0 g, bei 37⁰ dagegen erst in 1,5 g Bakterien auf.

Das Pepton sic. sine sale zeigte bei 22⁰ schon in 0,5 g, bei 37⁰ erst in 1,0 g Bakterien.

Das Pepton ex albumine enthielt seinerseits bei 22⁰ erst in 1,0 g und bei 37⁰ erst in 1,5 g Bakterien.

Es gilt somit ganz allgemein, daß Bakterien mit der optimalen Wachstumstemperatur von 22⁰ in größerer Anzahl in den Peptonen festzustellen waren, als solche mit der optimalen Wachstumstemperatur von 37⁰.

Auf die unregelmäßige Verteilung der Bakterien in den einzelnen Peptonen selbst wurde früher schon hingewiesen, und sie dürfte mit den Besonderheiten der Rohmaterialien, mit deren Verarbeitungsweise und mit dem daraus resultierenden physikalisch-chemischen Zustand (Teilchengröße, Adsorptionsfähigkeit usw.) des betreffenden Peptons in näherem Zusammenhang stehen.

Wenn auch die angeführten Tatsachen das eigentliche Wesen der Gärungserreger nicht erklären, so geben sie doch zweifellos Aufschluß über die Ursachen des verschiedenartigen Verlaufes der Gärungen unter „denselben" Bedingungen dadurch, daß sie einen Einblick in die Verteilungsverhältnisse der Bakterien in den Peptonen erlauben.

Da es sich in der vorliegenden Untersuchung vorwiegend darum gehandelt hat, die Bedeutung der Gärungserreger direkt für die Spaltung der Glucose „an sich" zu erklären, wurden die aus den verschiedenen Peptonen isolierten Bakterien, d. h. deren Eigenschaften, vorwiegend unter diesen Gesichtspunkten studiert, ohne die systematische Stellung der Bakterien zu berücksichtigen.

Mit Rücksicht auf diesen Sachverhalt sind denn auch in der Tabelle S. 72 die Eigenschaften der aus den verschiedenen Peptonen isolierten Bakterienstämme aufgeführt.

Die verschiedenen Peptone weisen zum Teil verschiedene Bakterienstämme auf, zum Teil aber kommen dieselben Stämme gemeinsam in den verschiedenen Peptonen vor. Dabei fällt sofort auf, daß neben Bakterienstämmen mit saccharolytischen Eigenschaften ebenso häufig

solche ohne diese vorhanden sind. Dagegen finden sich ausnahmslos in den Peptonen, mit welchen Gärungen beobachtet worden sind, Bakterienstämme vor, die saccharolytische Fermente besitzen, neben Bakterienstämmen ohne solche. Es betrifft dies die Peptone I_0, I, IV, V_0, V, VII und IX. Im Gegensatz dazu finden sich in den Peptonen, mit welchen niemals Gärungen beobachtet werden konnten, wie VI_0, VI und VIII, ausschließlich nur Bakterienstämme ohne saccharolytische Fermente. Es ist dies eine klare Begründung und gleichzeitig eine Bestätigung der diesbezüglichen Feststellungen in der ersten Mitteilung.

Eingehend die Eigenschaften der Bakterien der verschiedenen Peptone vergleichend mit den Erscheinungen der Gärungen der entsprechenden Peptonsysteme zu diskutieren, dürfte zweckmäßigerweise im nächsten Kapitel, das über die Bakterien der Gärsysteme Aufschluß gibt, geschehen. Hier möge nur noch darauf hingewiesen werden, daß der äußere Verlauf der Gärungen (und auch das Verhalten der nicht gärfähigen Systeme) mit dem „Wachstum in Bouillon bei 37°" der auf S. 72 erwähnten Bakterienstämme übereinstimmt.

Über das Verhältnis der Bakterienflora der Originalpeptone zu den in den Petrischalen aufbewahrten Peptonen ist zu sagen, daß im Pepton sic. cum sale „Siegfried"-Original vier verschiedene Stämme gefunden worden sind, während im Pepton sic. cum sale „Siegfried" nur deren zwei isoliert werden konnten. Dabei ist zu beachten, daß, abgesehen davon, daß der Stamm I_0 Nr. 4 im Pepton sic. cum sale „Siegfried" fehlt (was mit den in diesem Kapitel eingangs mitgeteilten Beobachtungen erklärt sein dürfte), der Stamm I_0 Nr. 1, der offensichtlich mit dem Stamm I Nr. 2 identisch ist, im Pepton sic. cum sale „Siegfried" ganz bedeutende Veränderungen in seinen fermentativen Eigenschaften erlitten haben muß.

Ganz ähnliche Verhältnisse sind bei den Stämmen des Pepton „Witte"-Original und des Pepton „Witte" in der Petrischale zu konstatieren: Verminderung der Bakterienstämme und Veränderung, d. h. Reduktion der fermentativen Eigenschaften der Stämme im Pepton „Witte" aus der Petrischale gegenüber denjenigen aus dem Pepton „Witte"-Original.

B. Die Bakterien der Gärsysteme.

Die *Schlatter*sche Versuchstechnik (s. dort S. 368) zur Herstellung der Gärsysteme birgt für die bakteriologische Untersuchung derselben verschiedene Unzulänglichkeiten. Es sei nur an das Erhitzen im Wasserbade, an das darauf folgende Filtrieren durch einen gewöhnlichen Filter an der Luft und dann endlich an das Einfüllen in die nicht sterilen Saccharimeter erinnert. Da es aber für die vorliegenden Untersuchungen von ausschlaggebender Bedeutung war, sowohl über die Herkunft, als auch über die Zahl der Bakterien, die in die Gärsysteme gelangen, orientiert zu sein, wurden die Gärversuche nunmehr unter *aseptischen* Bedingungen ausgeführt.

Zur Identifizierung der Bakterien in den Gärsystemen wurden folgende Versuchsbedingungen eingehalten[1]):

Gleich nach Isolierung der Bakterien aus den Peptonen wurden unter Wahrung völliger Sterilität mittels sterilen Wassers eine Glucoselösung von 2 Proz. und auf dieselbe Weise Lösungen der verschiedenen Peptone von ebenfalls 2 Proz. hergestellt. In sterile Reagenzgläser wurde unter Wahrung völliger Sterilität je 0,1 g Natriumbicarbonat abgewogen. Mittels steriler Pipetten wurden diese Reagenzgläser mit 5 ccm Glucoselösung beschichtet, worin sich das Bicarbonat auflöste. Diesen Glucose-$NaHCO_3$-Lösungen wurden nunmehr mit sterilen Pipetten je 5 ccm der verschiedenen 2proz. Peptonlösungen zugesetzt, so daß nach erfolgter Durchmischung ein System von je 1 Proz. der verschiedenen Peptone mit Glucose und $NaHCO_3$ vorlag. Dieses System enthielt die aus den Peptonen stammenden Bakterien. Diese Gärlösungen wurden ihrerseits unter völliger Asepsis in sterile Saccharimeter eingefüllt und sogleich bei 37° bebrütet.

Mit jedem Pepton wurden je drei Parallelversuche angesetzt und ein Kontrollversuch, d. h. einige Gärmischungen, die kein Pepton, sondern lediglich je 1 Proz. Glucose und Natriumbicarbonat enthielten (die 5 ccm Peptonlösung wurden durch steriles Wasser ersetzt). Nach einer Bebrütungszeit von etwa 38 Stunden zeigten die verschiedenen Gärlösungen folgende Veränderungen:

Gärversuch	Gasbildung	Bakterienwachstum (Trübung)	Gärversuch	Gasbildung	Bakterienwachstum (Trübung)
I_{o_1}	—	+	VI_1	—	+
I_{o_2}	+	++	VI_2	—	+
I_{o_3}	—	+	VI_3	—	—
I_1	—	+	VII_1	—	+
I_2	—	+	VII_2	—	+
I_3	—	+	VII_3	—	—
IV_1	—	—	VIII_1	—	—
IV_2	—	+	VIII_2	—	+
IV_3	—	—	VIII_3	—	+
V_{o_1}	+	++	IX_1	—	+
V_{o_2}	+	++	IX_2	—	+
V_{o_3}	—	+	IX_3	+	++
V_1	—	—	Kontrolle 1	—	—
V_2	—	+	„ 2	—	—
V_3	—	+	„ 3	—	—

— = kein Gas bzw. keine Bakterien.
\+ = ganz spärliches Bakterienwachstum.
++ = kräftiges Bakterienwachstum.

Der makroskopische Verlauf der Gärungen der angeführten Systeme entspricht in allen wesentlichen Punkten den bereits gemachten Angaben[2]), mit der Ausnahme, daß einige der Gärlösungen (z. B. V_0, V und IX) bereits von Anfang an flockig getrübt erscheinen, indem

[1]) Soweit nicht besonderes vermerkt ist, sind alle späteren Versuche in der beschriebenen Art und Weise vorbereitet und durchgeführt worden.
[2]) Siehe diese Zeitschr. l. c.

die genannten Peptone in ihren 2proz. wässerigen Lösungen bereits ausflocken und der Verlauf der Gärungen, sowohl was das Bakterienwachstum (Trübung), als was dann auch die Gasproduktion anbetrifft, ein merklich intensiverer ist.

Wiederum wurde mit Hilfe des Plattenverfahrens die Isolierung der Bakterien der verschiedenen Gärlösungen auf Traubenzuckeragar bei 37° vorgenommen, und folgende Stämme wurden festgestellt (siehe Tabelle S. 72):

Es erscheint zweckmäßig, hier vorerst die aus den Peptonen und den entsprechenden Gärsystemen sowie aus den Rohmaterialien isolierten Bakterienstämme und deren Eigenschaften einzeln in ihrer Bedeutung für die Gärungen zu charakterisieren, um später auf Grund dieser Feststellungen die allgemeinen bakteriologischen Verhältnisse in den Peptonen, den entsprechenden Gärsystemen und Rohmaterialien vergleichend darzulegen.

1. Im Pepton sic. cum sale „Siegfried"-Original konnten in allen drei Parallelversuchen vier Bakterienstämme isoliert werden. Diese vier Stämme waren aber nicht gleichmäßig vertreten, indem sowohl in den mikroskopischen Präparaten des Gärsystems als auch in den von diesem und dem Pepton selbst angelegten Plattenkulturen zwei Bakterienstämme vorherrschten. Es sind dies die beiden Peptonstämme Nr. 4 und 1, bzw. diejenigen aus dem Gärversuch Nr. 2. Die anderen beiden Stämme aus dem Pepton, nämlich Nr. 2 und 3 und die aus dem ersten und dritten Gärversuch treten dagegen nur vereinzelt auf. Demgemäß dürfte der Verlauf der Gärung des Peptons I_0 im wesentlichen durch die Lebenseigentümlichkeiten der ovalen Kokken und der sporenbildenden Stäbchen beherrscht sein.

Da es sich hier neben bestimmten qualitativen offensichtlich auch um quantitative Verhältnisse handelt, unter denen die Bakterien spezifisch wirken können, wird der Beweis für diese Zusammenhänge entsprechend erst in derjenigen Mitteilung gebracht werden können, welche hier die quantitativen Verhältnisse berücksichtigt. Dies gilt allgemein auch für die Gärsysteme der anderen Peptone, soweit solche überhaupt in Frage kommen können. Dagegen dürften die beiden Bakterienstämme Nr. 2a und 2b aus dem Gärversuch mit den entsprechenden Stämmen Nr. 4 und 1 des Peptons I_0 identisch sein. Die übrigen Bakterienstämme des Peptons kommen demnach im Gärsystem gar nicht zur Entwicklung, sofern sie überhaupt in dasselbe hineingelangt sind. Die ungleichmäßige Verteilung der Bakterien in den einzelnen Parallelversuchen und entsprechend deren ungleichmäßiger Gäreffekt kommt hier deutlich zum Ausdruck und dürfte durch die diesbezüglichen früheren Angaben verständlich erscheinen.

2. Aus dem Pepton sic. cum sale „Siegfried" konnten zwei Bakterienstämme isoliert werden. Es sind dies Nr. 1 und 2, wobei der Kokkenstamm Nr. 2 stark überwiegt. Es wurde früher schon auf den zahlenmäßigen Unterschied der Peptone I_0 und I in bezug auf ihren Bakteriengehalt hingewiesen. Hier tritt deutlich hervor, daß der besonderen Aufbewahrungsweise des Peptons I, die Bakterienstämme Nr. 2 und 4 des Peptons I_0 „zum Opfer gefallen" sein müssen, indem sie jenem fehlen. Die beiden Stämme Nr. 1 und 2 des Peptons I dürften je den beiden Stämmen Nr. 3 und 1 des Peptons I_0 entsprechen. Es tritt also im Pepton I noch die Sarcine

Bakterienstämme aus den Gärversuchen	Gramfärbung	Morphologische Eigenschaften	[illegible] Glucose Säurebildend nach	Glucose Gasbildend nach	Lactose, Milch gerinnend nach	Proteolytisch Ferment bei Gelatine ve flüssigt nac	Wachstum in Bouillon bei 37°	Wachstum auf Schrägagar bei 37° (Farbstoffbildung)
I_0 Nr. 1	+	Stäbchen beweglich, schlank, fadenbildend	16 Std.	—	—	—	streng aerobe leichte Trübung	—
„ 2a	+	Stäbchen beweg1., schlank bis kurz, Sporen	14 Std.	—	4 Tg.[1]	5 Tg.	Kräftige silberweiße Kahmhaut	grauweiß
„ 2b	+	Kokken rundlich oval, in Ketten u. Trauben	16 Std.	—	24 Std.	—	Bodenkuppe mit Flocken	—
„ 3	+	Stäbchen beweglich, Sporen	—	—	—	—	Kahmhaut u. leichte diffuse Trübg.	grauweiß
I „ 1		Nichts angegangen [2])						
„ 2	+	Stäbchen beweg1., schlank bis kurz, Sporen	24 Std.	—	—	—	Kahmhaut u. leichte diffuse Trübg.	grauweiß
„ 3	+	Stäbchen beweglich, Sporen	24 Std.	—	—	—	streng aerobe, leichte Trübung	—
IV „ 1		Nichts angegangen [2])						
„ 2	+	Stäbchen beweglich, Sporen	—	—	—	—	Kahmhaut u. leichte diffuse Trübg.	grauweiß
„ 3	+	„ „ „	—	—	—	—	„ „ „ „ „ „	grauweiß
V_0 „ 1a	+	Stäbchen beweglich, kräftig, plump, Sporen oval	36 Std.	—	5 Tg.	4 Tg.	schwach diffuse Trübung	graugelblich
„ 1b	—	Stäbchen kurz, beweglich	16 Std.	16 Std.	—	—	diffuse Trübung und staubartiger Bodensatz	—
„ 1c	+	Stäbchen kurz, kräftig, kurze Ketten	—	—	—	30 Tg. (?)	schwach diffuse Trübung	graugelb fettig
„ 2	—	Stäbchen dick, plump, verschieden lang	16 Std.	16 Std.	24 Std.	—	diffuse Trübung und schleimiger Bodensatz	—
„ 3		Nichts angegangen [2])						
V „ 1, 2, 3		„ „						
VI „ 1, 2, 3		„ „						
VII „ 1		„ „						
„ 2	+	Stäbchen plump, gelegentlich verdickt, fadenbildend	—	—	—	—	diffuse Trübung	—
VIII „ 1, 2		Nichts angegangen [2])						
„ 3	—	Stäbchen dünn, fadenbildend, Sporen	—	—	—	—	diffuse Trübung	—
IX_0 „ 1, 2		Nichts angegangen [2])						
„ 3a	+	Stäbchen plump, fadenbildend	16 Std.	—	24 Std.	16 Tg.	diffuse Trübung	gelbweiß
„ 3b	+	Stäbchen beweglich, schlank, fadenbildend, Sporen	—	—	5 Tg.	5 Tg.	kräftige Kahmhaut	grauweiß

[1]) Keine Säuregerinnung! (p_H = 7,2 bis 7,4.) — [2]) Siehe S. 75, Plattenkulturen steril.

aus dem Pepton I_0 auf; sie hat dabei allerdings außer ihrer Wachstumseigenheit auch ihre Pigmentbildung verändert, während der Kokkenstamm sein lactosespaltendes Ferment ganz eingebüßt zu haben scheint. Unter diesen bakteriellen Voraussetzungen ist denn auch der völlig negative Gäreffekt des Peptons I verständlich und wird noch verständlicher unter Berücksichtigung der bakteriellen Verhältnisse des Gärsystems selbst. Es findet sich dort insgesamt noch ein einziger Bakterienstamm vor, und zwar Nr. 2, der identisch ist mit Nr. 3. Er ist nur schwach vertreten. Es handelt sich anscheinend um den Stamm Nr. 4 des Peptons I_0 bzw. den Bakterienstamm Nr. 2 des Gärsystems dieses Peptons. Allerdings scheint auch dieser Stamm sein lactosespaltendes und sein proteolytisches Ferment verloren zu haben, ähnlich dem Kokkenstamm Nr. 2 im Pepton I. Beachtenswert ist ferner, daß im Gärsystem Nr. 1 des Peptons I überhaupt keine Bakterien angingen, ein deutliches Zeichen der allgemeinen Verminderung der Bakterien, und ferner, daß der Kokkenstamm Nr. 2 im Gärsystem des Peptons I nicht aufkommen konnte, wogegen dann aber der im entsprechenden Pepton nicht nachgewiesene Stamm des Gärsystems Nr. 2 (= Nr. 3) sich entwickeln konnte. Seine Entwicklung und, wie schon angedeutet, auch seine fermentativen Eigenschaften sind im Vergleich zu seiner ursprünglichen Form, dem Stamm Nr. 4 im Pepton I_0 gehemmt. So dürften auch hier wiederum die besonderen, ungünstigen bakteriellen Verhältnisse für den Gärverlauf des Peptons I bestimmend sein.

3. Im Pepton sic. e carne finden sich bedeutend einfachere Verhältnisse vor. Der Bakterienstamm Nr. 1 ist ein sporentragendes Stäbchen, das sowohl in geringem Maße saccharolytische (Lactose) als auch ebensolche proteolytische Fermente erzeugt, nicht aber glucosespaltende. (?) Der andere Stamm, Nr. 2, ist ein kleiner Kokkus von Semmelform, der nur langsam Glucose spalten kann. Diese beiden Stämme sind im Pepton spärlich vertreten.

Noch spärlicher aber ist der einzige Bakterienstamm im Gärsystem des Peptons IV vorhanden. Im Gärversuch Nr. 1 ging nichts an, während aus Nr. 2 und 3 das gleiche sporentragende Stäbchen isoliert werden konnte. Es dürfte sich um den Stamm Nr. 1 des Peptons IV handeln, wobei dieser anscheinend seine geringen fermentativen Eigenschaften völlig eingebüßt hat und nunmehr im Glucose-Pepton-$NaHCO_3$-System als strenger Aerobier sein kümmerliches Dasein fristet. Für den Kokkenstamm des Peptons scheinen obige Lebensbedingungen zu ungenügend zu sein, als daß dieser schwache Stamm das Pepton IV zu einem gärfähigen bestimmen könnte.

4. Aus dem Pepton sic. „Witte"-Original konnten acht Bakterienstämme isoliert werden. Nach den Erfahrungen mit diesem Pepton, in dessen Gärverlauf eine Haupt- und eine Nebengärung[1]) beobachtet werden konnte, mußten entsprechend aus dem Pepton und dem betreffenden Gärsystem auch solche Bakterien isoliert werden, die Glucose bis zu Kohlendioxyd zerlegen können. Und in der Tat, der Stamm Nr. 1, ein Gramnegatives, plumpes Kurzstäbchen, stellt ein solches Bakterium dar. Es produziert außerdem ein Glucose und Lactose säuerndes Ferment, während Gelatine nicht angegriffen wird. Die Stämme Nr. 3, 5 und 8 sind morphologisch verschiedene Kokken, denen aber kaum eine direkte Bedeutung für die Gärung zukommen dürfte, indem alle diese Stämme keine — oder

[1]) Siehe diese Zeitschr. l. c.

doch erst nach längerer Wachstumsperiode — saccharolytischen oder proteolytischen Fermente zu erzeugen fähig sind. Dasselbe gilt für den Stamm Nr. 4, die Sarcine. Der Stamm Nr. 7, großer Kokkus, könnte allein praktisch als Gärungsursache in Frage kommen. Immerhin könnte dies zufolge seines nach 36 Stunden wirksamen glucosespaltenden Ferments erst in einer späteren Phase der Gärung von Bedeutung sein.

In den drei Gärversuchen des Peptons V_0 fanden sich insgesamt nur vier Bakterienstämme vor, welche sich wiederum ganz ungleichmäßig auf die einzelnen Versuche verteilen. Aus dem Gärversuch Nr. 3 waren überhaupt keine Bakterien herauszuzüchten. Im Gärversuch Nr. 2 findet sich als einziger Stamm ein Gram-negatives Kurzstäbchen, das in derselben Zeit, wie der Bakterienstamm Nr. 1, aus dem Pepton selbst sowohl Glucose zu Säure und bis zu Gas zerlegt, als auch Lactose angreift, während es ebensowenig wie jenes Gelatine verflüssigt. Die beiden Stämme dürften identisch sein. Aus dem Gärversuch Nr. 1 sind drei Stämme isoliert worden. Nr. 1c, ein Gram-positives Kurzstäbchen, das in kurzen Ketten auftritt (Streptobazillus). Es besitzt aber außer einem ganz geringen proteolytischen Ferment keine sonst beachtenswerten Eigenschaften. Daneben findet sich der Stamm Nr. 1b, ein Gram-negatives, bewegliches Kurzstäbchen, dessen saccharolytische Fermente wiederum Glucose zu Säure und bis zu Gas zerlegen können, die Lactose aber nicht angreifen. Und endlich ist der Stamm Nr. 1a aus diesem Gärversuch ein sporentragendes, Gram-negatives Kurzstäbchen, das Glucose und Lactose zu Säure, ohne Gasbildung, abbaut und, wenn auch erst etwas spät, Gelatine peptonisiert. Es dürfte dieser Stamm identisch sein mit dem Stamm Nr. 2 aus dem Pepton selbst.

Es ergibt sich daher auch für das Pepton sic. „Witte"-Original bzw. dessen Gärsystem, daß sein Verlauf durch die fermentativen Eigenschaften der in ihm wirksamen Bakterien, vor allem aber durch die Lebenseigentümlichkeiten der drei Bakterienstämme Nr. 1a, 1b und 2 bestimmt wird.

5. Aus dem Pepton sic. „Witte" wurden vier Bakterienstämme isoliert. Es hat somit eine Verminderung der Bakterien im Pepton zufolge des besonderen Aufbewahrungsmodus stattgefunden. Nach früheren Angaben wurden im Pepton sic. „Witte"-Original 200 Bakterien pro Gramm festgestellt, während das Pepton sic. „Witte" nur 150 in der gleichen Menge enthielt. Es liegen demnach bei den „Witte"-Peptonen dieselben Verhältnisse vor wie bei den „Siegfried"-Peptonen!

Was für Bakterienstämme sind nunmehr noch vorhanden? Der Stamm Nr. 1, ein anscheinend fermentloser Kokkus, dürfte keine wesentliche Rolle spielen. Der Stamm Nr. 2, das sporentragende Kurzstäbchen, dürfte identisch sein mit dem Stamm Nr. 2 aus dem Pepton V_0. Seine fermentativen Eigenschaften erscheinen allerdings merklich abgeschwächt. Der Stamm Nr. 3, ein kleiner Staphylokokkus, tritt nur ganz vereinzelt auf. Er zerlegt aber Glucose in 16 Stunden unter deutlicher Säurebildung, ohne Gas, und ebenso verflüssigt er Gelatine. Der Stamm Nr. 4 endlich stellt ein Gram-positives, großes, kräftiges Stäbchen dar, dessen glucosespaltende Eigenschaften sich äußerst langsam entwickeln.

Es ist demnach kein kräftig fermentierender Bakterienstamm im Pepton V vorhanden. Dieses Resultat kann so wenig wie das der Gärversuche mit diesem Pepton als überraschend empfunden werden. Es sind in den Gärversuchen wohl einige Bakterien angegangen, aber weder ihre

Anzahl noch ihre fermentativen Eigenschaften genügen zur Auslösung eines Gäreffektes.

6. Aus dem Pepton sic. „Merck" waren zwei Bakterienstämme isolierbar. Beide Stämme sind ungefähr mit je vier bis sechs Kolonien pro Zählplatte und Gramm Pepton vertreten. Es sind dies die beiden Stämme Nr. 1, ein kräftiges Stäbchen, und Nr. 2, ein großer Kokkus. Beide Stämme weisen erst nach mehr als 36 Stunden fermentative Eigenschaften auf, und diese sind nur gegen Glucose eingestellt, die ganz schwach, ohne Gasproduktion, zu Säure gespalten wird.

In den entsprechenden Gärversuchen des Peptons VI Nr. 1 bis 3 konnten keine Bakterien mehr nachgewiesen werden, was ohne weiteres den fehlenden Gäreffekt in diesen Versuchen und somit auch den des Peptons „Merck" überhaupt erklärt.

7. Aus dem Pepton sic. sine sale war nur ein einziger Bakterienstamm isolierbar. Er stellt einen schwach vertretenen kleinen Kokkus dar, der ein saccharolytisches Ferment gegen Glucose nach 48 Stunden und gegen Lactose nach 2 Tagen bildet, während Gelatine von ihm erst nach 14 Tagen angegriffen wird.

In den Gärversuchen des Peptons VII gelangt lediglich im Versuch Nr. 2 ein Gram-positives, plumpes Stäbchen zur schwachen Vermehrung. Dieses Stäbchen scheint indifferent zu sein, indem es in keinem der vorgelegten Nährmilieux die bisher beobachteten Veränderungen erzeugen kann. Nichtsdestoweniger ist es interessant, festzustellen, daß dieses Stäbchen, trotzdem es im Pepton VII vorhanden sein muß, daselbst nicht nachgewiesen werden konnte, wohingegen der im Pepton VII vorhandene Kokkenstamm im Gärsystem Pepton-Glucose-$NaHCO_3$ sich anscheinend nicht entwickelt hat, so daß im Pepton sic. sine sale auch kein Gäreffekt beobachtet werden konnte.

8. Aus dem Pepton ex albumine konnte ebenfalls nur ein einziger Stamm isoliert werden. Es liegen dieselben Verhältnisse vor wie beim Pepton VII. Auch in bezug auf die Gärversuche, die alle des Gäreffekts ermangeln. Nur darin besteht zwischen beiden Peptonen ein Unterschied, daß der Kokkenstamm in Pepton VIII ebenfalls keine fermentativen Eigenschaften aufweist, wie das beim Gram-negativen, sporenbildenden Stäbchen im Gärversuch Nr. 3 der Fall ist, während der Kokkenstamm des Peptons VII ein saccharolytisches Ferment besitzt. Dieser Unterschied wird später für beide Peptone von Bedeutung sein.

9. Aus dem Pepton „Witte" von *Kahlbaum* ließen sich wiederum vier Bakterienstämme isolieren. Der Stamm Nr. 1, ein Gram-positives, kräftiges, plumpes Stäbchen, produziert nach 16 und 24 Stunden seine entsprechend gegen Glucose und Lactose wirksamen Fermente, während Gelatine erst nach 16 Tagen peptonisiert wird. Der Stamm Nr. 2, ein kleiner Kokkus, produziert erst nach 48 Stunden bzw. 2 Tagen seine gegen Glucose und Lactose wirksamen Fermente, während er Gelatine erst nach 14 Tagen verflüssigt. Der Stamm Nr. 3 ist ein Gram-positives, sporentragendes Stäbchen, das nur Lactose allein nach 4 Tagen anzugreifen vermag und nach 7 Tagen auch Gelatine verflüssigt. Endlich der Stamm Nr. 4, ein kleiner Kokkus, ist anscheinend völlig indifferent in bezug auf seine zuckerspaltende und Gelatine verflüssigende Wirkung.

In den drei Gärversuchen des Peptons IX_0 sind zwei Bakterienstämme festgestellt worden. Im Versuch Nr. 1 sind keine Bakterien angegangen,

ebensowenig im Versuch Nr. 2. Einzig im Versuch Nr. 3 konnten zwei Bakterienstämme festgestellt werden. Der Stamm Nr. 3a dürfte dasselbe Gram-positive Stäbchen darstellen, wie es als Stamm Nr. 1 des Peptons IX bereits beschrieben worden ist, während der Stamm Nr. 3b ziemlich sicher mit dem Peptonstamm Nr. 3 identisch ist. Diese drei Bakterienstämme bestimmen daher den Gäreffekt des Peptons IX, während die beiden Peptonstämme Nr. 2 und 4 im Gärsystem keine geeigneten Lebensbedingungen gefunden zu haben scheinen.

C. Die Bakterien der Komponenten (Rohmaterialien) der Peptone.

Es erschien nunmehr nicht uninteressant, etwas über die Herkunft der in den verschiedenen Peptonen festgestellten Bakterienstämme zu erfahren, insbesondere nachdem die Untersuchungen aus den Kapiteln A. und B. nahelegten, daß die verschiedenen, dort beschriebenen Bakterienstämme den verschiedenartigsten biologischen Milieus entstammen könnten, und daß ferner von den relativ zahlreichen Bakterienstämmen der untersuchten Peptone nur einige wenige Stämme in den entsprechenden Gärsystemen die Ursache der Gärung darstellen.

Es erhob sich hier die Frage, ob eine zufällige und vorwiegend durch die Luft bedingte Infektion den verschiedenen Peptonen ihre Bakterien vermittelt habe, oder ob spezifische Bakterienstämme aus den Rohmaterialien dies getan hätten. In diesem letzteren Falle würde der Verlauf der Gärung — in bestimmten Grenzen — mehr durch die biologische Herkunft ihrer Komponenten (Rohmaterialien der Peptone), als durch die feinere chemische Zusammensetzung der fertigen Peptone[1]) bedingt sein.

Aus technischen Gründen — es wäre nicht leicht gewesen, Auskunft über das genaue Herstellungsverfahren all der hier berücksichtigten Peptone zu bekommen — und um die an sich schon relativ ausgedehnte Arbeit nicht noch weitläufiger zu gestalten, wurde die Untersuchung über die Frage der Herkunft der Bakterien auf die Rohmaterialien des Peptons sic. cum sale „Siegfried" beschränkt.

Bei Anlaß der Versuche zur Herstellung eines sterilen Peptons[2]) konnten wir die von der Firma A.-G. vormals B. Siegfried in Zofingen-Schweiz uns in zuvorkommender Weise zur Verfügung gestellten Angaben über die Rohmaterialien und die Herstellungsweise des Peptons sic. cum sale „Siegfried" benutzen. Die genannte Firma überließ uns gleichzeitig die von ihr zur Peptonherstellung verwendete Gelatine, während wir gemäß der Vorschrift die notwendigen Ingredienzien (aseptisch gewonnene Schweinsmagen und Pankreasdrüse) in dankens-

[1]) Siehe *Schlatter*, diese Zeitschr. **131**, 373/75 und 375/78.

[2]) Worüber in einer späteren Mitteilung berichtet werden wird.

Bakterienstämme der Peptonkomponenten	Gramfärbung	Morphologische Eigenschaften	Saccharolyt. Ferment bei 37° aus Glucose: Säurebildend nach	Glucose: Gasbildend nach	Lactose, Milch gerinnend nach	Proteolyt. Ferment bei 22° Gelatine verfl. nach	Wachstum in Bouillon bei 37°	Wachstum auf Schrägagar bei 37° (Farbstoffbildung)
Pankreassaft								
Nr. 1	+	Kokken rundlich oval, Ketten u. Trauben	16 Std.	—	24 Std.	—	Bodenkuppe mit Flocken	bläulich irisierend
„ 2	+	Stäbchen kurz, plump	16 Std.	—	—	—	diffuse Trübung	graubraun
„ 3	+	Hefe klein	36 Std.[1]	36 Std.[1]	—	—	kräftige diffuse Trübung	bräunlich rosa, Fettglanz
Schweinsmagen								
Nr. 1	+	Stäbchen beweg., schlank bis kurz, Sporen	14 Std.	—	3 Tg.[2]	4 Tg.	Kahmhaut	grauweiß
„ 2	+	Kokken rundlich oval, Ketten u. Trauben	16 Std.	—	24 Std.	—	Bodenkuppe mit Flocken	—
„ 3	+	Stäbchen kräftig, kurz, Sporen	—	—	—	4 Tg.	diffuse flockige Trübung	grauweiß
Gelatine								
Nr. 1	+	Stäbchen beweg., schlank bis kurz, Sporen	14 Std.	—	4 Tg.[2]	4 Tg.	Kahmhaut silberglänzend	grauweiß
„ 2	+	Hefe klein	36 Std.[1]	36 Std.[1]	—	—	diffuse Trübung	bräunlich rosa, Fettglanz

[1]) Gedeiht bei 37° nicht; Temperaturoptimum 22°, liefert wenig Säure.
[2]) Keine Säuregerinnung! (p_H = 7,2 bis 7,4.)

werter Weise vom Züricher städtischen Schlachthause erhielten. Diese Rohmaterialien wurden unter Wahrung der Sterilität genau nach Vorschrift weiter verarbeitet, und mit Hilfe des Plattenverfahrens wurden auf Traubenzuckeragar aus den drei Komponenten: 1. Pankreassaft, 2. wässerige Aufschwemmung des fein zerkleinerten Schweinsmagens und 3. wässerige Gelatinesuspension die folgenden Bakterienstämme herausgezüchtet (s. nebenstehende Tabelle):

1. *Pankreassaft.* Es konnten hier drei bzw. zwei Bakterienstämme isoliert werden. Voraus muß bemerkt werden, daß diese Stämme in einer relativ geringen Individuenzahl vertreten waren, insbesondere der Stamm Nr. 2. Der Stamm Nr. 1, ein Gram-positiver Kokkus, dürfte mit seinen saccharolytischen und den übrigen Eigenschaften dem Stamm Nr. 2b aus dem Gärsystem des Pepton sic. cum sale „Siegfried“-Original entsprechen. Der Stamm Nr. 2, ein Gram-positives,

plumpes Kurzstäbchen, das einzig in Traubenzuckerbouillon wenig Säure produziert, hat kein deutliches Analogon aufzuweisen, ebenso gilt dies für den Stamm Nr. 3, die Hefe, welche allerdings Glucose zu Säure und zu Gas (CO_2) zerlegt, dies aber nur unterhalb 37°, indem sie optimal bei 22° gedeiht.

2. *Schweinsmagen.* Hieraus ließen sich drei Bakterienstämme isolieren, von denen insbesondere die beiden ersten in großen Mengen vertreten sind, während der Stamm Nr. 3 nur vereinzelt zu finden war. Es dürfte auffallen, daß der Stamm Nr. 1, das Gram-positive, sporentragende Stäbchen identisch ist mit Stamm Nr. 4 aus dem Gärsystem des Peptons sic. cum sale „Siegfried"-Original. Der Stamm Nr. 2 aus dem Schweinsmagen dagegen dürfte identisch sein mit dem Stamm Nr. 1 aus dem Pepton I_0, der sich, wie eben gesehen wurde, auch im Pankreassaft vorfindet. Der Stamm Nr. 3 endlich, ein kräftig sporentragendes Stäbchen, ist wohl direkt für eine Gärung bedeutungslos.

3. *Gelatine.* Aus ihr sind zwei bzw. ein einziger Bakterienstamm isoliert worden. Er wurde ungefähr zu 1000 Individuen pro Gramm Gelatine festgestellt, während der bereits im Pankreassaft beobachtete Hefestamm nur schwach vertreten ist. Der Bakterienstamm der Gelatine ist offensichtlich mit dem Stamm Nr. 4 aus dem Gärsystem I_0 identisch.

Fassen wir die in dieser Mitteilung gewonnenen Versuchsergebnisse zusammen, so kommen wir zu folgenden Feststellungen:

1. Das Pepton ist als direkte Ursache der Gärungserscheinungen anzusprechen, sofern es Träger von Bakterien ist.

2. Entsprechend einer bereits früher gemachten Beobachtung kommt nur dann ein Pepton als Gärungsursache in Frage, wenn es Träger von Bakterien ist, die in traubenzuckerhaltigen Nährsubstraten und im besonderen im Gärsystem Glucose-Pepton-$NaHCO_3$ bei 37° ein saccharolytisches Ferment zu bilden vermögen.

3. Diese Bakterien sind bei den verschiedenen Peptonen teilweise die gleichen, teilweise in ihren allgemeinen biochemischen Eigenschaften verschieden.

4. Der Gärvorgang bei den verschiedenen Peptongärsystemen ist unter sonst gleichen Versuchsbedingungen durch die biochemischen Eigenschaften der Peptonbakterien bestimmt.

5. Die verschiedenen Bakterienstämme der Peptone nehmen an den Gärungen nicht gleichmäßig Anteil. Es konnten in den Gärsystemen der verschiedenen Peptone nie alle Bakterienstämme derselben wiedergefunden werden, sondern immer nur einige wenige. Es sind dies vorwiegend solche Stämme mit saccharolytischen Eigenschaften. Daneben kommen aber auch solche vor, die überhaupt keine oder nur proteolytische Fermente zeigen.

6. Das Glucose-Pepton-$NaHCO_3$-System kann dementsprechend als selektives Nährsubstrat angesprochen werden.

7. Der Gärverlauf in den verschiedenen Peptongärsystemen wird bestimmt durch das Vorhandensein der genannten Bakterienstämme, wobei deren Wachstumserscheinungen in Bouillon die makroskopischen Veränderungen der Gärsysteme beherrschen.

8. Nach den Ergebnissen für das Pepton sic. cum sale „Siegfried" entsprechen die im Pepton primär vorhandenen Bakterienstämme (Stämme aus den Rohmaterialien) den selektierten Bakterienstämmen, so daß hier — und wahrscheinlich auch bei den anderen Peptonsystemen — der Gärverlauf vorwiegend durch die biologische Herkunft der Peptonkomponenten bestimmt sein dürfte. Die Mehrzahl der anderen in dem Pepton vorgefundenen Bakterienstämme dürften später (sekundär) in die fertigen Peptone gelangt sein.

Über die Veränderung des Blutzuckergehaltes bei durch Blutgifte erzeugter innerer Asphyxie.

Von

Kenji Tadenuma.

(Aus der Universitätsklinik zu Tokio, Abteilung Prof. *Irisawa.*)

(Eingegangen am 7. Juli 1923.)

Mit 2 Abbildungen im Text.

Die in der Folge einer Mobilisierung des Leberglykogens nach verschiedenartiger Behandlung auftretende Hyperglykämie ist seit langem sichergestellt. Mehrere Autoren beobachteten ein Ansteigen des Blutzuckergehaltes nach der Einwirkung von Blutgiften (Leuchtgas, Kohlenoxyd usw.) auf die Versuchstiere und schrieben es einer inneren Asphyxie zu. Weder konnte indessen in ihren Versuchen diese Vermutung bewiesen werden, noch scheint in ihnen die innere Asphyxie die einzige Ursache der beobachteten Hyperglykämie gewesen zu sein. Zudem waren ihre Blutzuckerbestimmungen unzureichend.

Nachdem ich bei meinen Arbeiten über Geschwulstmetastasen bei Hühnern wiederholt gefunden hatte, daß nach Injektion von salzsaurem Phenylhydrazin starke Hyperglykämien auftraten, während *Isaak* und *Handrick*[1]) ohne jeden Erfolg eine solche bei Kaninchen experimentell hervorzurufen versucht hatten (sie führten das negative Ergebnis ihrer Versuche darauf zurück, daß ihre Tiere ungeeignet wären), fühlte ich mich veranlaßt, diese Frage näher zu untersuchen.

Zu den Versuchen wurden meistens Kaninchen, aber auch Hühner und Mäuse verwendet. Es wurden ihnen wechselnde Mengen einer 1proz. Lösung von salzsaurem Phenylhydrazin in 10proz. Alkohol, bei einigen Versuchsreihen auch Saponin intravenös oder subkutan injiziert und in regelmäßigen Intervallen Blut entnommen. Der Blutzucker wurde nach der Methode von *Bang*[2]) bestimmt. Nur bei Mäusen mußte anders verfahren werden, da hier die Entnahme eines Tropfens Blut eine so starke Verletzung bedeutet, daß durch sie allein bereits ein Ansteigen des Zuckergehaltes verursacht wird. Es konnte also einem Tiere nur einmal Blut abgenommen werden; daher wurden zu jeder Bestimmung neue Tiere verwendet und die jeweiligen Durchschnittswerte verglichen. Es zeigte sich nun, daß die Behandlung

---

[1]) Deutsch. Arch. f. klin. Med. **109**, 1913.

[2]) Diese Zeitschr. **50**, 1913.

mit Phenylhydrazin und mit Saponin auch in relativ großen Mengen (6 bis 10 ccm je Kilogramm Körpergewicht) nur eine minimale, oft auch gar keine bemerkbare Hyperglykämie hervorrief, wenn die Tiere nüchtern oder gar im Hungerzustande waren. Waren sie dagegen vorher gefüttert worden, so bewirkte die gleiche Behandlung ein beträchtliches Ansteigen des Blutzuckerspiegels. Dies Verhalten steht in auffälligem Gegensatz zu der Wirkung von Adrenalininjektionen, die bekanntlich auch bei nüchternen und hungrigen Tieren deutliche Hyperglykämien veranlassen.

Dieser vorläufige Befund ließ bereits vermuten, daß die hyperglykämische Wirkung der geprüften Blutgifte unabhängig von dem Glykogenvorrat der Leber sei und nur zu der jeweils neu aufgenommenen Nahrung in Beziehung gesetzt werden könne. Die Erklärung wäre dann in einer unvollständigen Verbrennung des Zuckers zu suchen.

Zur Bestätigung dieser Vermutung dienten mehrere Versuchsreihen. Zunächst wurde die Höhe und Dauer der hyperglykämischen Nachwirkung von subkutanen und intravenösen Traubenzuckerinjektionen geprüft, einmal, nachdem den Tieren eine Stunde vorher eine nicht zu geringe Menge Phenylhydrazinchlorid eingespritzt worden war, dann zur Kontrolle ohne diese voraufgehende Behandlung. Es versteht sich von selbst, daß die Versuchstiere nüchtern waren oder hungerten, damit jede Nebenwirkung ausgeschlossen war. Hierbei zeigte sich nun, daß der Blutzuckerwert in beiden Fällen wenige Minuten nach der Zuckerinjektion in gleicher Weise stark erhöht war. Während er aber bei den Kontrolltieren schnell zurückging und schon nach etwa einer Stunde den Normalwert fast wieder erreicht hatte, klang er bei den mit Phenylhydrazin behandelten Tieren nur ganz langsam ab und hielt sich auch bei Beendigung der Versuche noch bedeutend über dem Normalwert. Hier kann in der Tat nur eine unvollständige Verbrennung als Grund der bleibenden Hyperglykämie angenommen werden.

Wurde statt der Glucose Adrenalin injiziert, so zeigten sich entsprechende Verhältnisse. Bei den Versuchstieren stieg die durch die Injektion von 1 ccm einer 1 prom. Adrenalinlösung bewirkte Hyperglykämie schneller und höher an und klang dann sehr viel langsamer ab als bei den Kontrolltieren.

Das Phenylhydrazin war in verdünntem Alkohol gelöst angewendet worden. Es war also immerhin daran zu denken, daß der Alkohol auch für sich allein irgendwelche Einflüsse auf den Blutzuckerspiegel ausübt. Diesbezügliche Versuche, die mit 10- und 20proz. Alkohol vorgenommen wurden, zeigten jedoch, daß eine solche Nebenwirkung nicht eintrat.

Da es sich demnach zu bestätigen schien, daß die Hyperglykämie unter den beschriebenen Bedingungen nur von der Nahrungszufuhr abhängig ist, war es in zweiter Linie wichtig, das Verhalten der Leber, d. h. die etwaige Beeinflussung ihrer Glykogenbildungskraft, zu untersuchen. Da hier individuelle Verschiedenheiten eine größere Rolle spielen, so mußten die Durchschnittswerte von etwas breiteren Spielräumen verglichen werden. Ich ließ Kaninchen 4 bis 7 Tage lang hungern, um den Glykogenvorrat der Leber auf ein Minimum herabzudrücken. Dann wurden den Versuchstieren etwa 15 ccm Phenylhydrazinlösung injiziert, während die Kontrolltiere unverändert blieben, sodann nach einer Stunde beiden Gruppen so viel Traubenzuckerlösung (meist 20proz.) injiziert, daß auf das Tier 5 g Zucker entfielen. Einige Stunden nach der Zuckerinjektion wurden die Tiere getötet und das Glykogen nach der von *Emamura* modifizierten *Pflüger*schen Methode bestimmt. Es konnte festgestellt werden, daß die Assimilationskraft der Leber unverändert blieb. Nur in einem einzigen Falle zeigte sich bei einem Versuchstiere ein etwas geringerer Glykogengehalt, jedoch kann dieser Fall sehr wohl als individuelle Anomalie angesehen werden.

Es blieb nun übrig, den schlüssigen Beweis zu führen, daß die hyperglykämische Wirkung der Blutgifte dem Blute selbst zuzuschreiben, mit anderen Worten, daß seine glykolytische Kraft vermindert ist. Zu diesem Zwecke wurden Versuchstiere und Kontrolltiere gefüttert und den Versuchstieren einige Zeit danach Phenylhydrazin injiziert. Hierauf wurden 1 bis 2 Stunden später den Tieren beider Gruppen je 10 bis 12 ccm Blut aus der Karotisvene steril abgezapft und in kleinen Kölbchen bei 37° im Brutschrank belassen. Der Blutzuckergehalt wurde unmittelbar nach der Entnahme sowie nach 6 bis 8 Stunden bestimmt. Es zeigte sich in klarer Weise, daß der Zuckergehalt des vergifteten Blutes sehr viel langsamer abnahm als der des Normalblutes, daß also die glykolytische Kraft des Blutes durch Phenylhydrazin stark herabgesetzt wird.

Auch die äußere Erscheinung des Blutes war bei allen beschriebenen Versuchen nach der Einwirkung der Gifte verändert. Die Farbe schlägt wie bei Methämoglobinbildung sofort ins schwärzliche um, die Zahl der roten Blutkörperchen vermindert sich nach wenigen Stunden rapide. Diese Wirkung (und entsprechend die Hyperglykämie) ist nach der Behandlung mit alkoholischen Lösungen von Phenylhydrazin intensiver als mit wässerigen. Vergleiche über den verschiedenen Grad der schädigenden Wirkung dieser Lösungen werden später auch noch bei biologischen Untersuchungen über die Erythrocyten (Gasstoffwechsel) angestellt werden. Hingegen wird die Zahl der weißen Blutkörperchen nicht nur nicht vermindert, sondern sogar meistens vermehrt.

Zusammenfassung.

1. Blutgifte wie Phenylhydrazin und Saponin bewirken Hyperglykämie in nennenswertem Umfange nur nach voraufgehender Nahrungsaufnahme; sie beruht demnach nicht auf einer Mobilisierung des Leberglykogens.

2. Die Glykogenbildungskraft der Leber bleibt hierbei unverändert.

3. Die glykolytische Kraft des Blutes sowie die Zahl der roten Blutkörperchen wird herabgesetzt. Zwischen beiden scheint demnach ein funktioneller Zusammenhang zu bestehen. Die innere Asphyxie beruht offenbar auf der Schädigung der Erythrocyten.

Aus den Protokollen.

Bei der Injektion von Phenylhydrazin zeigt das Tier etwas erhöhte Atmungsfrequenz, bleibt aber sonst ganz ruhig; bei Hühnern ist dies Verhalten noch deutlicher als bei Kaninchen. In der Mehrzahl der Fälle zeigten die Tiere am nächsten Tag wieder normales Verhalten, nur einige starben 6 bis 10 Stunden nach der Injektion.

Injektion von Phenylhydrazin bei nüchternen oder hungernden Tieren.

a) Kaninchen.

1. Datum: 12. Dezember 1921. Kaninchen, Körpergewicht 3000 g, 14,5 ccm 1 proz. Phenylhydrazinlösung subkutan injiziert, Blutzuckerwert:

vor Injektion	0,10 Proz.
1 ½ Stunden nach der Injektion	0,13 „
3 „ „ „ „	0,12 „
4 „ „ „ „	0,12 „

2. Datum: 15. Dezember 1921. Kaninchen, Körpergewicht 2950 g, 14 ccm subkutan injiziert, Blutzuckerwert:

vor Injektion	0,12 Proz.
1 Stunde nach der Injektion	0,13 „
3 „ „ „ „	0,13 „
4 „ „ „ „	0,12 „

b) Hühner.

Datum: 12. Dezember 1922. Bei Nüchternheit 5 ccm subkutan injiziert, Blutzuckerwert:

vor Injektion	0,11 Proz.
½ Stunde nach der Injektion	0,12 „
4 „ „ „ „	0,14 „

Injektion von Saponin unter denselben Umständen.

1. Kaninchen. Körpergewicht 3260 g, nach 4 Tagen Hunger bis auf 2691 g reduziert, dann 6,5 ccm einer 1 proz. wässerigen Saponinlösung intravenös injiziert, Blutzuckerwert:

vor der Injektion	0,11 Proz.
45 Minuten nach der Injektion	0,14 „
96 „ „ „ „	0,14 „
4 Stunden „ „ „	0,12 „

2. Kaninchen. Körpergewicht 3650 g, nach 4 Tagen Hunger reduziert bis auf 2200 g, dann 8,5 ccm der 1 proz. Saponinlösung intravenös injiziert, Blutzuckerwert:

vor der Injektion	0,14 Proz.
½ Stunde nach der Injektion	0,15 „
1 „ „ „ „	0,12 „
2 „ „ „ „	0,12 „
3 „ „ „ „	0,13 „
4 „ „ „ „	0,12 „

3. Kaninchen. Körpergewicht 2300 g, bei Nüchternheit 4,5 ccm Saponinlösung intravenös injiziert, Blutzuckerwert:

vor der Injektion	0,08 Proz.
1 Stunde nach der Injektion	0,07 „
2 „ „ „ „	0,08 „
3 „ „ „ „	0,09 „

Injektion von Phenylhydrazin nach Fütterung.

a) Kaninchen.

1. Datum: 21. Februar 1922. Kaninchen. Körpergewicht 2000 g, um 10 Uhr gefüttert, $1^1/_4$ Stunde später 15 ccm Phenylhydrazin subkutan injiziert, Blutzuckerwert:

vor der Injektion	0,08 Proz.
1½ Stunden nach der Injektion	0,23 „
3 „ „ „ „	0,19 „

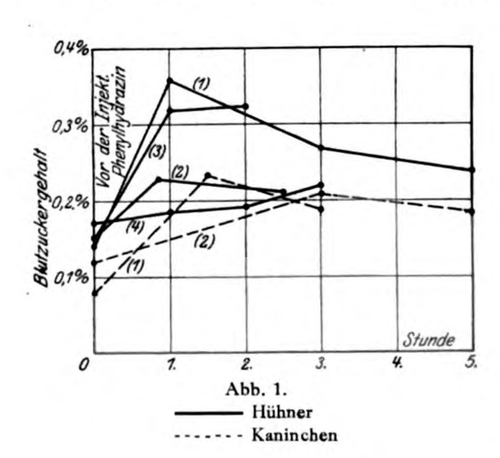


Abb. 1.
——— Hühner
- - - - - - Kaninchen

2. Datum: 7. März 1922. Kaninchen. Körpergewicht 1700 g, um 10 Uhr gefüttert, ½ Stunde nach der Fütterung 11,3 ccm subkutan injiziert, Blutzuckerwert:

vor der Injektion	0,12 Proz.
3 Stunden nach der Injektion	0,21 „
5 „ „ „ „	0,19 „

b) Hühner.

1. Datum: 4. Dezember 1921. Hühner von 2500 g, nach der Fütterung 7 ccm subkutan injiziert, Blutzuckerwert:

vor der Injektion	0,14 Proz.
1 Stunde nach der Injektion	0,36 „
3 „ „ „ „	0,27 „
5 „ „ „ „	0,24 „

2. Datum: 10. Februar 1922. 2 Stunden nach Fütterung 10 ccm subkutan injiziert, Blutzuckerwert:

vor der Injektion	0,15 Proz.
45 Minuten nach der Injektion	0,23 „
2 ½ Stunden „ „ „	0,21 „

3. Datum: 18. Februar 1922. Körpergewicht 2000 g, 14 ccm subkutan injiziert, Blutzuckerwert:

vor der Injektion	0,15 Proz.
1 Stunde nach der Injektion	0,32 „
2 „ „ „ „ starb das Huhn. Blutzuckergehalt	0,32 „

4. Datum: 16. Februar 1922. Körpergewicht 2980 g, 3 Stunden nach der Fütterung 15 ccm injiziert, Blutzuckerwert:

vor der Injektion	0,17 Proz.
1 Stunde nach der Injektion	0,18 „
3 „ „ „ „	0,19 „
4 „ „ „ „	0,21 „

5. Datum: 13. Februar 1922. 7 ccm subkutan injiziert, Blutzuckerwert:

vor der Injektion	0,12 Proz.
nach der Injektion schwankt der Blutzuckergehalt zwischen . . . . 0,16 und	0,21 „

c) Mäuse.

Vor der Injektion Blutzuckerwert: 0,1, 0,09, 0,107, 0,113, 0,1 Proz. **Durchschnitt 0,102 Proz.**

½ Stunde nach der Injektion 0,19, 0,21, 0,17 Proz. **Durchschnitt 0,19 Proz.**

1 Stunde nach der Injektion 0,16, 0,14, 1,08 Proz. **Durchschnitt 0,16 Proz.**

Injektion von Saponin nach Fütterung.

1. 7,5 ccm 1 proz. Saponinlösung subkutan injiziert, Blutzuckerwert nach der Fütterung:

vor der Injektion	0,11 Proz.
1 Stunde nach der Injektion	0,1 „
2 „ „ „ „	0,15 „
3 „ „ „ „	0,26 „
4 „ „ „ „	0,32 „
5 „ „ „ „	0,33 „
6 „ „ „ „	0,21 „

2. Kaninchen. Körpergewicht 3000 g, nach der Fütterung 7,5 ccm 1 proz. Saponinlösung subkutan injiziert, Blutzuckerwert:

vor der Injektion	0,1 Proz.
20 Minuten nach der Injektion	0,13 „
3 Stunden „ „ „	0,17 „
4 „ „ „ „	0,19 „
5 „ „ „ „	0,14 „

Intravenöse Injektion von Traubenzucker nach Behandlung mit Phenylhydrazin.

1. Datum: 15. September 1922. Kaninchen, drei Tage lang hungernd. Körpergewicht 2250 g, 17 ccm Phenylhydrazinlösung subkutan injiziert, eine Stunde später 15 ccm einer 20proz. wässerigen Traubenzuckerlösung (angewendeter Zucker unrein, wirklicher Gehalt 65 Proz. Traubenzucker) möglichst mit gleicher Geschwindigkeit eingeführt. Blutzuckerwert:

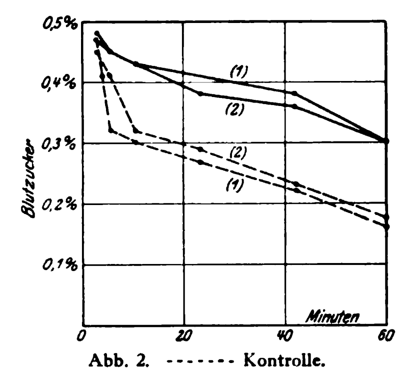


Abb. 2. ------ Kontrolle.

3 Minuten nach der Injektion	0,48 Proz.
6 „ „ „ „	0,45 „
12 „ „ „ „	0,43 „
42 „ „ „ „	0,38 „
1 Stunde „ „ „	0,3 „
1½ „ „ „ „	0,26 „

Kontrollkaninchen. Körpergewicht 2200 g, 3 Tage hungernd, 15 ccm 20proz. Traubenzuckerlösung injiziert, ohne vorherige Phenylhydrazininjektion. Blutzuckerwert:

3 Minuten nach der Injektion	0,47 Proz.
6 „ „ „ „	0,32 „
12 „ „ „ „	0,3 „
42 „ „ „ „	0,22 „
1 Stunde „ „ „	0,16 „

2. Datum: 26. September 1922. Kaninchen. Körpergewicht 2450 g, nüchtern 15 ccm Phenylhydrazinlösung subkutan injiziert, 5 Stunden später 15 ccm 20proz. Traubenzuckerlösung zugeführt. Blutzuckerwert:

3 Minuten nach der Injektion	0,46 Proz.
6 „ „ „ „	0,45 „
12 „ „ „ „	0,43 „
24 „ „ „ „	0,38 „
42 „ „ „ „	0,36 „
1 Stunde „ „ „	0,3 „

Kontrollkaninchen. Körpergewicht 2350 g, nüchtern 15 ccm 20proz. Traubenzuckerlösung zugeführt. Blutzuckerwert:

3 Minuten nach der Injektion	0,45 Proz.
6 ,, ,, ,, ,, ...	0,41 ,,
12 ,, ,, ,, ,, ...	0,32 ,,
24 ,, ,, ,, ,, ...	0,29 ,,
1 Stunde ,, ,, ,, ...	0,16 ,,

Subkutane Injektion von Traubenzucker nach Behandlung mit Phenylhydrazin.

1. Kaninchen. Körpergewicht 2250 g, nüchtern 15 ccm Phenylhydrazinlösung subkutan injiziert, eine Stunde später 10 ccm der 20proz. Traubenzuckerlösung zugeführt. Blutzuckerwert:

30 Minuten nach der Injektion	0,19 Proz.
1 Stunde ,, ,, ,, ...	0,22 ,,
2 ,, ,, ,, ,, ...	0,25 ,,
3 ,, ,, ,, ,, ...	0,29 ,,
4 ,, ,, ,, ,, ...	0,25 ,,

Kontrollkaninchen. Körpergewicht 2350 g, ohne vorherige Phenylhydrazininjektion, 10 ccm 20proz. Traubenzuckerlösung injiziert. Blutzuckerwert:

30 Minuten nach der Injektion	0,13 Proz.
1 Stunde ,, ,, ,, ...	0,17 ,,
2 ,, ,, ,, ,, ...	0,20 ,,
3 ,, ,, ,, ,, ...	0,19 ,,
4 ,, ,, ,, ,, ...	0,15 ,,

Die Wirkung von Adrenalin nach Behandlung mit Phenylhydrazin.

a) Kaninchen. Gewicht 2250 g, 15 ccm Phenylhydrazin und 1½ Stunden später 1 ccm Adrenalin subkutan injiziert. Blutzuckerwert:

vor der Injektion	0,1 Proz.
½ Stunde nach der Injektion	0,14 ,,
1 ,, ,, ,, ,, ...	0,3 ,,
2 ,, ,, ,, ,, ...	0,31 ,,
3 ,, ,, ,, ,, ...	0,29 ,,
4 ,, ,, ,, ,, ...	0,29 ,,

Kontrollkaninchen. Gewicht 2320 g, 1 ccm Adrenalin subkutan injiziert, ohne vorherige Phenylhydrazininjektion. Blutzuckerwert:

vor der Injektion	0,1 Proz.
½ Stunde nach der Injektion	0,14 ,,
1 ,, ,, ,, ,, ...	0,16 ,,
2 ,, ,, ,, ,, ...	0,23 ,,
3 ,, ,, ,, ,, ...	0,24 ,,
4 ,, ,, ,, ,, ...	0,24 ,,

Prüfung von verdünntem Alkohol auf hyperglykämische Wirkung.

a) Kaninchen. Gewicht 1900 g, 1 Stunde nach der Fütterung 20 ccm 10proz. Alkohols subkutan injiziert. Blutzuckerwert:

vor der Injektion	0,12 Proz.
40 Minuten nach der Injektion	0,11 ,,
2½ Stunden ,, ,, ,, ...	0,11 ,,
4 ,, ,, ,, ,, ...	0,12 ,,

b) Kaninchen. Gewicht 3100 g, 1 Stunde nach der Fütterung 20 ccm 20proz. Alkohols subkutan injiziert. Blutzuckerwert:

vor der Injektion	0,13	Proz.
1 Stunde nach der Injektion	0,10	„
2 „ „ „ „	0,12	„
3 „ „ „ „	0,12	„
5 „ „ „ „	0,11	„

c) Kaninchen. Gewicht 3350 g, 1 Stunde nach der Fütterung 15 ccm 20proz. Alkohols subkutan injiziert. Blutzuckerwert:

vor der Injektion	0,12	Proz.
½ Stunde nach der Injektion	0,13	„
1 „ „ „ „	0,11	„
2½ „ „ „ „	0,13	„
3½ „ „ „ „	0,1	„

d) Kaninchen. 84 Minuten nach der Fütterung 20 ccm 20proz. Alkohols subkutan injiziert. Blutzuckerwert:

vor der Injektion	0,11	Proz.
½ Stunde nach der Injektion	0,10	„
2 Stunden 12 Minuten nach der Injektion	0,089	„
3½ Stunde nach der Injektion	0,1	„
6 „ „ „ „	0,1	„

Die Glykogenbildungskraft der Leber ohne und mit Phenylhydrazinbehandlung.

Vier Kaninchen. Körpergewicht 2400 bis 2600 g, nach 5 Tagen Hunger reduziert bis auf 2200 bis 2300 g. Von diesen vier Kaninchen drei Kaninchen je 15 ccm der 1proz. alkoholischen Lösung von Phenylhydrazin subkutan, 1 Stunde danach eine 20proz. Traubenzuckerlösung (Zuckermenge 5 g für ein Kaninchen) intravenös injiziert, 6 Stunden später werden die Tiere getötet, dann das Leberglykogen nach der von *Emamura* modifizierten *Pflüger*schen Methode bestimmt.

Ein Kontrollkaninchen, kein Phenylhydrazin, nur Traubenzuckerlösung (Zuckermenge 5 g) intravenös injiziert; 3 Stunden nach der Injektion getötet; Leberglykogen bestimmt.

Glykogengehalt der Leber:

1. Versuchstier	1,453	Proz.
2. „	1,483	„
3. „	1,453	„
4. Kontrolltier	1,452	„

b) Vier Kaninchen. Körpergewicht 2400, 2600, 2100, 2300 g, nach 5 Tagen Hunger reduziert auf 1900 bis 2300 g. Von diesen vier Kaninchen drei Kaninchen je 15 ccm der 1proz. alkoholischen Lösung von Phenylhydrazin subkutan injiziert, 1 Stunde nach der Phenylhydrazininjektion 15 ccm der 20proz. Traubenzuckerlösung intravenös injiziert; 4½ Stunden nach der Traubenzuckerinjektion getötet; dann Leberglykogen bestimmt.

Ein Kontrollkaninchen, kein Phenylhydrazin, lediglich 15 ccm der 20proz. Traubenzuckerlösung intravenös injiziert, 4½ Stunden nach der Traubenzuckerinjektion getötet, dann Leberglykogen bestimmt.

Glykogengehalt der Leber:

1. Versuchstier	1,1466 Proz.
2. „	1,5836 „
3. „	1,3430 „
4. Kontrolltier	1,1780 „

c) Vier Kaninchen. Körpergewicht 2300, 2230, 1750, 1900 g; 7 Tage gehungert. Von diesen vier Kaninchen drei Tieren je 15 ccm 1 proz alkoholische Lösung von Phenylhydrazin subkutan injiziert, 1 Stunde nach der Injektion 20 ccm der 20 proz. Traubenzuckerlösung intravenös eingeführt, 5 Stunden nach der Traubenzuckerlösungsinjektion getötet; dann Leberglykogen bestimmt.

Ein Kontrollkaninchen. Kein Phenylhyd·azin, nur 20 ccm der 20 proz. Traubenzuckerlösung intravenös zugeführt; 1 Stunde nach der Traubenzuckerzufuhr getötet; dann Leberglykogen bestimmt.

Glykogengehalt der Leber:

1. Versuchstier	2,7521 Proz.
2. „	2,1251 „
3. „	1,8742 „
4. Kontrolltier	2,6044 „

d) Vier Kaninchen. Körpergewicht 2600, 2280, 2450, 2300 g; nach 4 Tagen Hunger reduziert auf 2280, 1780, 1960, 1850 g; drei Kaninchen je 20 ccm 1 proz. alkoholische Phenylhydrazinlösung subkutan injiziert; 1 Stunde nach der Phenylhydrazininjektion 20 ccm der 20 proz. Traubenzuckerlösung intravenös zugeführt, 6 Stunden nach der Traubenzuckerzufuhr getötet; dann Bestimmung des Leberglykogens.

Glykogengehalt der Leber:

1. Versuchstier	2,0407 Proz.
2. „	1,9069 „
3. „	2,0958 „
4. Kontrolltier	2,0403 „

Nur in Versuch c) kann man beobachten, daß die Kraft der Leber zur Glykogenbildung nach Injektion von Phenylhydrazin etwas schwächer ist als normalerweise. In den drei Experimenten a), b), d) ist die Kraft zur Glykogenbildung nach Injektion von Phenylhydrazin ebenso stark wie ohne diese Injektion.

Die glykolytische Kraft des Blutes mit und ohne Behandlung mit Phenylhydrazin.

Kaninchen. Injektion von Phenylhydrazin; aus den Carotisvenen dieser Kaninchen wurde eine bestimmte Menge Blut steril entnommen, in einen Kolben gebracht und im Brutschrank bei 37° stehen gelassen. Von Zeit zu Zeit bestimmte ich den Blutzuckergehalt; gleichzeitig bestimmte ich auch den Blutzuckergehalt des Kontrolltieres, dem kein Phenylhydrazin injiziert worden war.

a) Kaninchen. 2115 g, 15 ccm alkoholischer Phenylhydrazinlösung subkutan injiziert. 1 Stunde nach der Injektion entnahm ich Blut aus den Venen und ließ es im Kolben 6 Stunden lang im Brutschrank stehen; dann bestimmte ich den Blutzuckergehalt:

gleich nach der Entnahme	0,115 Proz.	Abnahme von 55 Proz.
nach 6 Stunden Stehen im Brutschrank .	0,052 „	

Kontrolle: Kaninchen ohne Injektion von Phenylhydrazin. Körpergewicht 1920 g. Von diesem Kaninchen entnahm ich das Blut aus der Carotisvene. Kolben 6 Stunden lang im Brutofen. Blutzucker:

gleich nach der Entnahme	0,154 Proz.	Abnahme von 79 Proz.
nach 6 Stunden Stehen im Brutschrank .	0,033 ,,	

Dieser Versuch zeigt deutlich, daß die Glykolyse im Blut eines mit Phenylhydrazin behandelten Tieres langsamer vor sich geht als im normalen Zustand.

b) Kaninchen. Körpergewicht 2950 g; Injektion von 20 ccm alkoholischer Phenylhydrazinlösung subkutan injiziert; 2 Stunden nach der Injektion Blutentnahme, 6 Stunden im Brutofen stehen lassen. Blutzucker:

gleich nach der Entnahme	0,141 Proz.	Abnahme von 72 Proz.
nach 6 Stunden Stehen im Brutofen . . .	0,041 ,,	

Kontrollkaninchen: kein Phenylhydrazin, Körpergewicht 2600 g, von diesem Kaninchen das Blut aus der Carotisvene entnommen, in einen Kolben gebracht, 6 Stunden lang im Brutofen stehen gelassen, dann Blutzuckerwert bestimmt:

gleich nach der Entnahme	0,176 Proz.	Abnahme von 83 Proz.
nach 6 Stunden Stehen im Brutofen . . .	0,030 ,,	

c) Kaninchen. Körpergewicht 2600 g, Injektion von 20 ccm Phenylhydrazin subkutan, 1 Stunde nach der Injektion Blutentnahme; 8 ½ Stunden im Brutofen stehen gelassen, dann Blutzucker bestimmt:

gleich nach der Entnahme	0,152 Proz.	Abnahme von 41 Proz.
nach 8 ½ Stunden Stehen im Brutofen .	0,09 ,,	

Normalblut:

gleich nach der Entnahme	0,13 Proz.	Abnahme von 77 Proz.
nach 6 Stunden Stehen im Brutofen . .	0,03 ,,	

d) Kaninchen. Körpergewicht 1500 g; Injektion von 15 ccm Phenylhydrazinlösung subkutan, 1 Stunde nach der Injektion Blutentnahme, 6 Stunden im Brutofen stehen gelassen. Blutzucker:

gleich nach der Entnahme	0,142 Proz.	Abnahme von 59 Proz.
nach 6 Stunden Stehen im Brutofen . .	0,58 ,,	

Normalblut:

gleich nach der Entnahme	0,12 Proz.	Abnahme von 78 Proz.
nach 6 Stunden Stehen im Brutofen unter genau den gleichen Verhältnissen . . .	0,026 ,,	

e) Kaninchen. Körpergewicht 2550 g, Injektion von 20 ccm Phenylhydrazinlösung subkutan, 1 ½ Stunden nach der Injektion Blutentnahme, 6 ½ Stunden im Brutofen stehen gelassen; Blutzucker:

gleich nach der Entnahme	0,175 Proz.	Abnahme von 51 Proz.
nach 6 Stunden Stehen im Brutofen . .	0,086 ,,	

Normalblut:

gleich nach der Blutentnahme	0,13 Proz.	Abnahme von 73 Proz.
nach 6 Stunden im Brutofen unter gleichen Bedingungen	0,035 ,,	

Literatur.

1) *Underhill* und *Frank*, The Journ. of biochem. Chem. **17**, 1914. — 2) *Underhill*, *Frank* und *Murlem*, ebendaselbst, 1914. — 3) *Frank* und *Underhill*, ebendaselbst **27**, 1916. — 4) *Ivar Bang* und *Stenstrom*. diese Zeitschr. **50**, 1913. — 5) *Isaac* und *Handrick*, Deutsch. Arch. f. klin. Med. **109**, 1913. — 6) *Bang*, Blutzucker 1913. — 7) *Isaak* und *Handrick*, Deutsch. Arch. f. klin. Med. **109**, 1913. — 8) *Löwy*, ebendaselbst **120**, 1916. — 9) *Rolly* und *Oppermann*, diese Zeitschr. **48**, 1913. — 10) *K. Yamakami*, The Journ. of phys. 1919. — 11) *Cannon* und *Stewart*, ebendaselbst 1911. — 12) *Handerson* und *Underhill*, The Amer. Journ. of Phys. **28**. — 13) *Abderhalden*, Lehrb. d. physiol. Chem., III. Aufl., 1914. — 14) *Reginold*, The Journ. biol. Chem. **48**, 1921. — 15) *Einar*, *Langfeld*, ebendaselbst **46**, 1921. — 16) *Morawitz*, Arch. f. exper. Path. u. Pharm. **60**, 1909. — 17) *Frank* und *Isaac*, ebendaselbst **64**, 1911. — 18) *Hugo Wiener*, Physiol. Chem. **84**, 1913. — 19) *Derselbe*, Beitr. z. physiol. Chem. **80**, 1912. — 20) *Itami* und *Pratt*, diese Zeitschr. 1909. — 21) *Morawitz* und *Pratt*, Münch. med. Wochenschr. 1908. — 22) *Hanna Hirschfeld*, Folia haem. A. IX. — 23) *Rosenthal*, ebendaselbst A. X. — 24) *Fukushima Kanshi*. The Journ. of Biochemistry 1922. — 25) *Tadenuma*, *Hotta*, *Homma*, diese Zeitschr. **137**, 1923. — 26) *Tadenuma*, Zeitschr. f. Krebsforsch. **20**, Heft 4, 1923.

Über Peptisation der Aminosäuren unter der Einwirkung von Säuren und Alkalien.

Von

N. D. Zelinsky und **W. S. Ssadikow.**

(Aus dem Laboratorium für organische Chemie der Universität Moskau.)

(Eingegangen am 7. Juli 1923.)

Nach zurzeit herrschenden Anschauungen bestehen die Eiweißstoffe aus einer langen Kette von verschiedenen Aminosäuren, welche amidartig miteinander verknüpft sind; eine derartige Polypeptidkette wird durch Einwirkung von Säuren und Alkalien in einfachere Komplexe zerlegt und schließlich bis zu Aminosäuren abgebaut, welche als Bausteine des Eiweißmoleküls gelten müssen. Diese Bausteine sind nicht sekundär bzw. synthetisch entstanden und dürften gegen hydrolysierende Agenzien völlig indifferent sein. Man hat bisher nicht die Frage gestellt, ob die Aminosäuren selbst, diese Endprodukte der Hydrolyse, unter der Einwirkung von hydrolysierenden Agenzien sich verändern können; es verstand sich von selbst, daß diese Bausteine einerseits gegen Säuren und Alkalien absolut widerstandsfähig sind, und daß andererseits Aminosäuren bei den Bedingungen der Hydrolyse keine Kondensation oder Komplexierung erleiden. Diesem Standpunkte scheinen aber einige Tatsachen zu widersprechen. Unter biologischen Verhältnissen, nämlich bei enzymatischen Hydrolysen der Eiweißstoffe im lebenden Organismus, sind die Aminosäuren nur unbeständige Zwischenstufen, welche zur Bildung von lebendigen Substraten verwendet werden. Man muß also annehmen, daß hydrolysierende Agenzien auch im umkehrbaren Sinne wirksam sein können, d. h. unter Umständen kondensierend auf Aminosäuren wirken.

Die Überzeugung, daß Aminosäuren sich nicht unter dem Einfluß von Säuren verändern können, ist so fest geworden, daß man ein Verfahren zur Abspaltung von Peptiden aus dem Eiweißmolekül ausgearbeitet hatte, welches darin besteht, daß man den Eiweißkörper mit konzentrierten Säuren in der Kälte behandelt und die entstehenden Produkte als präformierte Bruchstücke auffaßt.

Wir haben einige Beobachtungen gemacht, welche mit den geltenden Vorstellungen über die Indifferenz von Aminosäuren den hydrolysierenden Agenzien gegenüber nicht übereinstimmen, und welche dagegen die Möglichkeit der Kondensationen und Komplexierungen von Aminosäuren bei „kalter Hydrolyse" aufweisen.

Die Einwirkung von Säuren auf Glycin.

Löst man 4 g Glycin in 200 ccm 25proz. H_2SO_4 und läßt die Lösung bei Zimmertemperatur 2 Stunden stehen, nimmt dann 5 ccm der Lösung, neutralisiert genau und titriert nach der Zugabe von Formol mit n/4 NaHO, so entspricht der Alkaliverbrauch dem Stickstoffgehalt gleich 16,1 Proz., anstatt 18,67 Proz. N des Glycins.

Kocht man die Lösung des Glycins in 25proz. H_2SO_4 während 6 Stunden und titriert wieder 5 ccm derselben nach Neutralisation mit Formol, so erhält man 15,4 Proz. N. Nach 18stündigem Kochen wird Stickstoffgehalt gleich 18,85 Proz.

Der Versuch zeigt, daß beim Lösen des Glycins in kalter 25proz. H_2SO_4 ein beträchtlicher Teil von NH_2-Gruppen, welche mit Formol titrierbar sind, maskiert wird, daß beim Kochen eine weitere Maskierung stattfindet, beim andauernden Kochen aber die maskierten Aminogruppen wieder erscheinen und die Werte des formoltitrierbaren Stickstoffs normal werden. Diese Art von Maskierung der NH_2-Gruppen unter dem Einfluß von Säure haben wir als „Peptisation" bezeichnet und als Vermutung ausgesprochen, daß dabei mehrere Glycinmoleküle sich in irgend einer Art verbinden; dieser Komplex wird durch längeres Kochen aufgespalten.

Wir führen noch eine Anzahl gleicher Versuche in folgender Tabelle an:

Angewandte Menge des Glycins g	Versuchsbedingungen	Verbrauch von n/4-NaOH ccm	Formoltitrierbarer Stickstoff Proz.	Menge des maskierten Stickstoffs Proz.
0,1787	gelöst in Wasser	9,5	18,60	0
0,1746	gelöst in 25proz. H_2SO_4 u. sofort neutralisiert	8,5	17,04	1,56
0,2125	in n/10 H_2SO_4 gelöst, erwärmt u. neutralisiert	10,6	17,46	1,14
0,1870		9,4	17,60	1,00
0,3764	in 25proz. H_2SO_4 gelöst, 1 Stunde auf dem Wasserbade erwärmt und neutralisiert	17,8	16,53	2.07
0,1449	in n/4 HCl gelöst und sofort neutralisiert	7,4	17,87	0,73

Die Versuche zeigen, daß ein einfaches Lösen des Glycins in Säuren genügt, um den Wert des formoltitrierbaren Stickstoffs bis 1,5 Proz. herabzudrücken. Beim kurzdauernden Erwärmen wird dieser Wert noch mehr erniedrigt.

Dampft man Glycin mit einer kleinen Menge konzentrierter HCl ab, so tritt dieselbe Erscheinung zutage.

0,2653 g Glycin gaben 12,5 ccm n/4 NaHO gleich 16,49 Proz. formoltitrierbaren Stickstoffs.

0,1023 g Glycin gaben nach *van Slyke* 0,01621 g oder 15,84 Proz. N.

Beim Abdampfen des Glycins mit Eisessig ist die Abnahme des formoltitrierbaren Stickstoffs gegen 3,5 Proz.

0,2600 g Glycin gaben 11,20 ccm n/4 NaHO oder 15,08 Proz. N.

Eingehend wurde noch das Verhalten des Glycins gegen konzentriertes HCl untersucht. Wir führen hier einige Versuche an.

10,817 g Glycin wurden in 300 ccm HCl (1,19) gelöst. 5 ccm der Lösung enthielten nach *Kjeldahl* 0,1801 g Glycin. 5 ccm wurden mit Formol titriert:

1. Nach dem Lösen des Glycins und sofortiger Neutralisation	16,90	Proz. N
Nach *van Slyke*	14,31	„ „
2. Nach 48stündigem Stehen der Lösung bei 18° und Neutralisation	16,32	„ „
3. Nach 3stündigem Kochen	18,65	„ „
4. „ 6 „ „	18,65	„ „
Nach *van Slyke*	14,92	„ „

Führt man die Bestimmung nach *van Slyke* in der Weise aus, daß man die Lösung des Glycins in HCl zuerst neutralisiert, so erhält man den Wert 14,31 Proz. N. Wenn man die Bestimmung in saurer Lösung vornimmt, so beobachtet man den Wert 18,95 Proz. N. Dampft man aber die vorher neutralisierte Lösung zur Trockne und löst den Rückstand im Wasser, so beträgt der Stickstoffwert 12,9 Proz. Wir haben es hier also mit ziemlich eigenartigen Verhältnissen zu tun. Konzentriertes HCl bewirkt schon in der Kälte eine Abnahme des formoltitrierbaren Stickstoffs gegen 3 Proz.; nach *van Slyke* beträgt diese Abnahme sogar gegen 4,5 Proz. Nach 3stündigem Kochen mit konzentriertem HCl kommt der gesamte formoltitrierbare Stickstoff wieder zum Vorschein, dagegen ist Aminostickstoff nach *van Slyke* nur in HCl-saurer Lösung total bestimmbar, d. h., wenn HCl und HNO_2 zusammen wirken. Beim Abdampfen von neutralisierten Lösungen des Glycins findet vielleicht irgend eine Art der Kondensation statt (12,9 Proz. N).

Das weite Auseinandergehen der Werte des Formol-N und *van Slyke*-N läßt sich durch die Vermutung erklären, daß dabei NH-Gruppen in derartiger Bindung gebildet werden, daß sie, wie bei Prolin, der Formoltitration zugänglich sind, für die *van Slyke*sche Reaktion aber untauglich sind. Regeneration des maskierten Stickstoffs bei längerer Einwirkung des kochenden HCl kann als eine umkehrbare Komplexierung eventuell Kondensation von Glycylresten gedeutet werden.

Ferner haben wir das Verhalten des Glycins gegen Ameisensäure studiert.

Es wurde eine Lösung des Glycins in 57,86proz. Ameisensäure bereitet. 5 ccm derselben enthielten 0,125 g Glycin. Nach sofortiger Neutralisation enthält die Probe 17,08 Proz. formoltitrierbaren Stickstoff.

Nach 3stündigem Kochen	12,88	Proz. N
„ 6 „ „	11,48	„ „
„ 12 „ „	11,48	„ „
„ 24 „ „	11,35	„ „

Starke Ameisensäure bewirkt schon in der Kälte die Maskierung von 1,6 Proz. des Formol-N; nach dem Kochen steigt die Peptisation bis zu 7,2 Proz. des Formol-N. Es ist auffallend, daß hier, im Gegensatz zu den Verhältnissen, die wir bei Mineralsäuren beobachten, beim

längeren Kochen keine Regeneration des formolmaskierten Stickstoffs stattfindet. Die durch Einwirkung von Ameisensäure auf Glycin entstehenden Komplexe werden durch Ameisensäure nicht wieder gespalten. Wenn man die Lösung des Glycins in Ameisensäure nach 24stündigem Kochen zur Trockne abdampft, so ist der Rückstand teilweise in Alkohol löslich, und dieser alkohollösliche Anteil ist mit Phosphorwolframsäure fällbar.

Das Verhältnis des Formol-N zu dem Gesamt-N (nach *Kjeldahl* bestimmt), in Prozenten des formoltitrierbaren Stickstoffs berechnet, ändert sich mit der Dauer der Ameisensäureeinwirkung auf Glycin in folgender Weise:

Nach sofortiger Neutralisation	93,38 Proz.
„ 24 Stunden	89,50 „
„ 48 „	78,33 „
„ 72 „	78,33 „
„ 3stündigem Kochen.	50,35 „
„ 6 „ „	50,24 „
„ 12 „ „	50,42 „

Nach 12stündigem Kochen des Glycins mit 50proz. Ameisensäure erhält man:

nach *Sörensen*	11,01 Proz. N
„ *van Slyke*	10,63 „ „
„ *Kjeldahl*	18,65 „ „

Beinahe 8 Proz. N werden in eine mit Formol untitrierbare und nach *van Slyke* unbestimmbare Form übergeführt (Imidstickstoff oder tertiärer Stickstoff).

Bei Abdampfen des Glycins mit 50proz. Ameisensäure ist der Stickstoffgehalt des Rückstandes nach Neutralisation:

nach *Sörensen*	14,43 Proz.
„ *van Slyke*	13,72 „
„ *Kjeldahl*	18,65 „

Auch schwächere Ameisensäure (11,5- und 1,12proz.) ruft ähnliche Erscheinungen der Maskierung von Formolstickstoff hervor, wie folgende Tabelle zeigt.

Versuchsbedingungen	11,5 proz. HCOOH N-Proz.	1,12 proz. HCOOH N-Proz.
Ohne Erwärmen	16,78	17,58
Nach Abdampfen	14,46	15,92
3 stündiges Kochen	14,46	16,85
Abdampfen	10,70	15,66
6 stündiges Kochen	14,20	16,85
Abdampfen	11,86	15,66
12 stündiges Kochen	14,75	18,00
Abdampfen	12,71	16,06

Hierzu ist zu bemerken, daß man beim einfachen Abdampfen des Glycins mit 11,5proz. Ameisensäure zu denselben Werten gelangt,

wie beim 12stündigen Kochen. Ein nachträgliches Abdampfen der gekochten Lösung erniedrigt die Werte des formoltitrierbaren Stickstoffs bedeutend mehr als ohne vorheriges Kochen. Bei 1,12proz. Ameisensäure ist die Abnahme des formoltitrierbaren Stickstoffs unter gleichen Verhältnissen eine geringere, und außerdem beobachtet man bei längerem Kochen (12 Stunden) eine teilweise Regeneration der normalen Werte des Formol-N. Wie alle diese Veränderungen zu erklären sind, kann man noch nicht sicher entscheiden. Es handelt sich wahrscheinlich um Kondensationen irgendwelcher Art, und wir haben diese Erscheinung als Peptisation der Aminosäuren bezeichnet.

Diese Peptisation kommt zustande auch bei Einwirkung von schwächeren Alkalien. Wir führen wieder nur einige von zahlreichen Versuchen an, welche wir mit Glycin und anderen Aminosäuren ausgeführt haben.

1. 6,5344 g Glycin wurden in 2 n NaHO gelöst und 5 ccm der Lösung, entsprechend 0,2185 g Glycin, sofort neutralisiert und mit Formol titriert; man erhält 15,06 Proz. N. Nach einstündigem Kochen: nach *Sörensen* 14,74 Proz., nach *Kjeldahl* 17,04 Proz. N.

2. 0,2110 g Glycin in 10 ccm n/10 NaHO gelöst, sofort neutralisiert und mit Formol titriert: 17,25 Proz. N.

3. 0,5176 g Glycin in 50 ccm n/10 NaHO gelöst und 2 Stunden erwärmt; nach Neutralisation wird mit Formol titriert. Man erhält nach *Sörensen* 15,82 Proz. N; nach *Kjeldahl* 16,69 Proz. N.

Bei sehr kurzdauernder Einwirkung von NaHO erleidet Glycin eine Abnahme von formoltitrierbarem Stickstoff, bisweilen bis 3,5 Proz. Beim Erwärmen mit n/10 NaHO entweicht ein Teil des Stickstoffs in Form von Ammoniak, und doch bleibt eine Differenz zwischen Gesamtstickstoff und formoltitrierbarem Stickstoff übrig.

Glycin erleidet also schon in der Kälte eine schnelle und seltsame Umgestaltung unter der Einwirkung von Säuren und Alkalien, auch wenn sie ziemlich geringe Konzentrationen haben; die Verhältnisse sind ähnlich denjenigen, denen wir unter biologischen Bedingungen begegnen, nämlich bei enzymatischen Spaltungen der Eiweißstoffe. Andererseits können bei nicht genügend langer Hydrolyse derselben mit kochenden konzentrierten Säuren und besonders bei „partieller Hydrolyse“ mit kalten konzentrierten Säuren in den Hydrolysaten nicht nur Aminosäuren als solche auftreten, sondern auch deren Umwandlungs- bzw. Kondensationsprodukte. Wir haben es mit irgend einer Art von Komplexierung zu tun; die Verbindung der einzelnen Aminosäuremoleküle ist aber wahrscheinlich keine ausschließlich peptidartige.

Ein Peptisationsprodukt des Glycins, welches 11,48 Proz. formoltitrierbaren Stickstoff aufwies, wurde mit Alkohol behandelt; man konnte dadurch eine alkohollösliche Fraktion abscheiden mit 2,94 Proz. N nach *Sörensen* und 2,13 Proz. N nach *van Slyke*.

Einen solchen Gehalt an Aminostickstoff würden wir z. B. im Hepta-Glycyl-Glycin antreffen (2,95 Proz.). Aber es ist bekannt, daß Glycylpeptide, nach *van Slyke* behandelt, den gesamten Stickstoff anzeigen. Demnach haben wir in diesem Falle keine peptidartige Bindung der Glycylreste vor uns. Nach wiederholter Peptisation der im Alkohol unlöslichen Fraktion bekommt man wieder eine alkohollösliche Fraktion mit 11,78 Proz. Formolstickstoff. Durch fraktionierte Kristallisation dieser Substanz ist es gelungen, einen Körper auszuscheiden, welcher in Gegenwart von Formol kein Alkali verbraucht, besitzt also keine freie Amino- und Carboxylgruppen. Dieser Körper erwies sich als Glycinanhydrid.

Vorläufig läßt sich nur die Vermutung aussprechen, daß die Peptisation der Aminosäuren einen komplizierten Vorgang darstellt, indem man vielleicht außer Peptidbindung zwischen Gruppen COOH und NH_2 der verschiedenen Moleküle der Aminosäure noch eine Methylenverknüpfung annehmen darf. Sie könnten z. B. folgender Art sein:

```
       NH2—CH——CH—NH—CO
           COOH COOH   CH.NH2
                       CH.NH2
                       COOH
bzw.   NH2—CH——CH—NH—CO
           COOH CO—NH—CH
                      CH.NH2
                      COOH.
```

Durch die Bildung ähnlicher Peptisationsprodukte kann man sowohl die Maskierung des Stickstoffs, wie auch die Regeneration derselben gut erklären; ebenfalls auch die Werte des Formol-N bei verschiedenen Peptisationsprodukten gut vorausberechnen.

Bei Methylenverknüpfung müssen zwei Atome Wasserstoff austreten. Das scheint der Fall zu sein, da Glycin nach dem Lösen in NaHO auf Methylenblau reduzierend wirkt (*Hasse*)[1].

Versuche mit Alanin.

Entsprechende Verhältnisse beim Alanin werden durch folgende tabellarische Zusammenstellung illustriert.

Nr.	Versuchsbedingungen	Formoltitrierbarer Stickstoff Proz.	Stickstoffabnahme Proz.
1	0,2660 g in Wasser gelöst . .	14,51	—
2	0,3141 g in 25,51 proz. H_2SO_4 gelöst, 24 Stunden bei 18° .	7,18	7,33
3	0,2978 g in konzentriertem HCl gelöst, 24 Stunden bei 18° .	10,93	3,58
4	0,2321 g in konzentriertem HCl gelöst, 2stündiges Kochen .	8,44	6,07

[1]) Diese Zeitschr. 28, 159.

Beim Alanin verläuft die Peptisation schneller und umfangreicher als beim Glycin. Bei Einwirkung von H_2SO_4 büßt Alanin die Hälfte des formoltitrierbaren Stickstoffs ein. Auch Ameisensäure, besonders beim Abdampfen, bewirkt eine bedeutende Abnahme des Formolstickstoffgehaltes, wie die nachstehende Tabelle zeigt.

50proz. Ameisensäure.

Versuchsbedingungen	Formolstickstoff Proz.
Nach sofortiger Neutralisation . .	9,34
Nach Abdampfen	7,34
1stündiges Kochen	
Neutralisation	9,04
Abdampfen	6,93
2stündiges Kochen	
Neutralisation	8,44
Abdampfen	6,93
3stündiges Kochen	
Neutralisation	8,30
Abdampfen	6,20
6stündiges Kochen	
Neutralisation	7,69
Abdampfen	6,03

Untersucht man die Produkte der Peptisation des Alanins, wie sie beim Abdampfen mit Ameisensäure entstehen, so findet man eine im Alkohol lösliche Fraktion mit 3,58 Proz. Formol-N, und eine im Alkohol unlösliche Fraktion mit 10,34 Proz. Formol-N.

Nach *einem* wiederholten Abdampfen der letzten mit Ameisensäure bekommt man einen alkoholischen Auszug des Trockenrückstandes mit 8,79 Proz. Formol-N und einen alkoholunlöslichen Anteil mit 9,55 Proz. Formol-N.

Vielleicht wird es bald gelingen, definierte Verbindungen aus den Peptisationsprodukten des Alanins abzuscheiden und die Verknüpfungsformen der einzelnen Moleküle aufzuklären.

Versuche mit Asparaginsäure.

Asparaginsäure als eine Verbindung mit zwei Carboxylgruppen und einer Aminogruppe müßte ohne Formolzusatz teilweise titrierbar sein, da nur eine Carboxylgruppe mit NH_2-Gruppe innerlich neutralisiert ist. Löst man z. B. 0,5400 g Asparaginsäure in 40 ccm n/4 NaHO und titriert mit n/4 HCl zurück, so beobachtet man einen Verbrauch von n/4 NaHO gleich 20,4 ccm, was 8,69 Proz. Na entspricht, anstatt 14,84 Proz. Na, berechnet für $C_4H_6NO_4Na$. Man bestimmt also auf diese Weise weniger an COOH, als theoretisch zu erwarten ist. Fügt man nun Formol hinzu und titriert wieder, so wird der gesamte Verbrauch an n/4 NaHO gleich 48,8 ccm, eventuell 20,8 Proz. Na, anstatt 26,0 Proz. Na, berechnet für

$C_4H_2NO_4Na_2$, oder anstatt 22,10 Proz. Na für Formylverbindung $C_5H_4NO_4Na_2$. Berechnet man aus den Werten des Alkaliverbrauches bei Formoltitration den N-Gehalt der Aminogruppe, so erhält man 18,40 Proz. Formol-N, anstatt 10,55 Proz. N der Theorie. Da aber auf zwei COOH nur eine NH_2 vorhanden ist, so muß der oben erhaltene Wert halbiert sein; man gelangt also zu 9,2 Proz. N statt 10,45 Proz.

Bei Titration von *Glutaminsäure* gegen Phenolphthalein wird etwas mehr NaHO verbraucht, als sich für eine einbasische Säure berechnet. Bei Formoltitration verhält sich Glutaminsäure wie eine nicht ganz zweibasische Säure [vgl. *Škola*[1])]. Beim Kochen der Glutaminsäure mit H_2SO_4 ändern sich die Azidität und Drehung, was durch Bildung von Glutiminsäure bedingt ist; es kommt also eine Lactamisation zustande. Formol ruft bei Glutaminsäure kaum einen Anstieg der Azidität hervor, wodurch die *Lactamformel dieser Säure bewiesen* ist.

Vielleicht haben wir ähnliche Verhältnisse auch bei der Asparaginsäure. Bei der Einwirkung von Säuren und Alkalien kommt eine teilweise Lactamisation zustande, wodurch die niedrigeren Werte des Formol-N und Abnahme der Azidität eine gute Erklärung finden.

D. Ravenna und *G. Businelli*[2]) geben an, daß Asparagin bei längerem Kochen sich teilweise in Asparagyl-asparaginsäure:

$$\begin{array}{l} \qquad\qquad\qquad\quad NH{-}CO{-}{-}{-}CH{-}CH_2{-}COOH \\ \qquad\qquad\qquad\quad | \qquad\qquad\quad | \\ HOOC{-}CH_2{-}CH{-}COOH \; NH_2 \end{array}$$

verwandelt.

Diese Verbindung kann sich vielleicht in Diketopiperazin-diessigsäure umwandeln:

$$\begin{array}{l} \qquad\qquad\qquad\quad NH{-}CO{-}CH{-}CH_2{-}COOH \\ \qquad\qquad\qquad\quad | \qquad\qquad | \\ HOOC{-}CH_2{-}CH{-}CO{-}NH. \end{array}$$

Löst man z. B. 0,4852 g Asparaginsäure in 25proz. H_2SO_4, neutralisiert sofort und titriert mit Formol, so wird der Alkaliverbrauch gleich 6,6 ccm n/4 NaHO, was 2,38 Proz. N entspricht und auf eine Anhydridbindung des größeren Anteils des Aminostickstoffs hindeutet.

Wir behalten uns vor, die Produkte der Peptisation verschiedener Aminosäuren, wie sie unter der Einwirkung von Säuren, Alkalien und Enzymen entstehen, näher zu untersuchen und für eine neue, von uns vermutete Verknüpfungsart, nämlich für die Methylenverknüpfungen der Aminosäuren, welche bei Komplexierung zustande kommen könnte, weitere Beweise zu sammeln. Allerdings scheinen uns die oben angeführten Beobachtungen über Peptisation der Aminosäuren wohl überzeugend genug, um die Aminosäuren nicht mehr als unbedingt beständige Endprodukte der Hydrolyse zu betrachten. Durch Peptisation der Aminosäuren im Verlaufe der Hydrolyse können sekundäre Komplexe gebildet werden, die im Eiweißmolekül nicht als solche präformiert zu sein brauchen.

---

1) Chem. Zentralbl. 1920, III, S. 619.

2) Gazz. 49, II, S. 303.

Einige Bemerkungen über die Triketohydrindenreaktion.

Von

W. S. Ssadikow und N. D. Zelinsky.

(Aus dem Laboratorium für organische Chemie der Universität Moskau.)

(Eingegangen am 7. Juli 1923.)

Ruhemann[1]) und später *Abderhalden*[2]) haben Triketohydrinden als ein neues Reagenz für Aminosäuren vorgeschlagen, welches beim Kochen eine intensive Violettfärbung zeigt. Jedoch hat sich bald erwiesen, daß außer Aminosäuren noch eine ganze Anzahl von verschiedenen Substanzen mit Triketohydrindenhydrat (Ninhydrin) ähnliche Färbungen geben; das sind nach *Neuberg*[3]) namentlich die Amine, Aminoaldehyde (Glucosamin), Aminosulfosäuren (Taurin) und manche anorganische Körper, außerdem primäre aliphatische Alkohole, ferner Aldehyde und Zuckerarten mit freien Aldehyd- und Carbonylgruppen.

Ruhemann erklärt die Pigmentbildung bei der Triketohydrindenreaktion folgendermaßen. Triketohydrinden wird zu einem sekundären Alkohol reduziert:

$$C_6H_4\left\langle\begin{matrix}CO\\CO\end{matrix}\right\rangle CO \longrightarrow C_6H_4\left\langle\begin{matrix}CO\\CO\end{matrix}\right\rangle CH.OH$$

und dieser Alkohol kondensiert sich mit einem Molekül des Triketohydrindens unter Bildung von Hydrindantin:

$$C_6H_4\left\langle\begin{matrix}CO\\CO\end{matrix}\right\rangle C.OH{-}O{-}CH\left\langle\begin{matrix}CO\\CO\end{matrix}\right\rangle C_6H_4.$$

Die Reaktion verläuft nur in Gegenwart von reduzierenden Aldehyd- oder Ketongruppen. Die Färbungen besitzen mehr einen rötlichen Stich und unterscheiden sich von der violettblauen Farbe der Pigmente, welche bei Anwesenheit von Aminosäuren mit freien Aminogruppen sich bilden. *Ruhemann* nimmt an, daß bei Aminosäuren es sich um

---

[1]) Journ. of the chem. Soc. Transact. **97**, 1438, 2025, 1910; **99**, 792, 1911; **101**, 780, 1912.

[2]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **77**, 249, 1912.

[3]) Diese Zeitschr. **56**, 500, 1913; **67**, 56, 1914.

ganz andere Pigmente handelt, nämlich, daß sich beim Erwärmen von Triketohydrinden mit Aminosäuren ein murexidartiger Komplex, Diketohydrindyliden-diketohydrindamin bilde:

$$C_6H_4\langle{}^{CO}_{CO}\rangle CH\,.\,N{=}C\langle{}^{CO}_{CO}\rangle C_6H_4.$$

Die Anwendung der Ninhydrinreaktion bei Untersuchung von Spaltungsprodukten der Eiweißstoffe ist dadurch erschwert, daß man diese beiden Pigmentarten nicht gut genug unterscheiden kann, und ferner dadurch, daß man es zumeist mit stark gefärbten Hydrolysaten zu tun hat, welche sich nicht entfärben lassen, und die Färbung, welche mit Ninhydrin sich bildet, nicht zu unterscheiden erlauben.

Diese Schwierigkeiten können leicht beseitigt werden, wenn man die braun gefärbte Flüssigkeit nach 2 bis 3 Minuten langem Kochen mit Ninhydrin abkühlt und mit 2 ccm Amylalkohol ausschüttelt. Amylalkohol wird violett gefärbt bei Gegenwart von Aminosäuren, und gelblich gefärbt oder bleibt farblos, wenn aldehyd- oder ketonartige Verbindungen zugegen sind. Die oben erwähnten zwei Arten von Ninhydrinpigmenten unterscheiden sich in bezug ihres Verhaltens gegen Amylalkohol. Außerdem ist das Pigment, welches von Aminosäuren gebildet wird, viel beständiger und tritt schneller zutage.

Nimmt man eine 1 proz. Lösung des Glycins mit 1 ccm Ninhydrinlösung (0,4 g in 100 ccm), so verschwindet die Färbung nicht nach 15 Minuten langem Kochen: Das Pigment ist gegen 1 proz. Phosphorsäure und n/10 NaHO beständig; es geht in Amylalkohol über. Die Färbungen, welche beim Kochen des Ninhydrins mit Glucose entstehen, sind unbeständig und werden von Amylalkohol nicht aufgenommen.

Glycin und Alanin geben die Färbungen mit Ninhydrin auch ohne Erwärmen. Methylalanin dagegen färbt sich in der Kälte nicht, sondern nur nach andauerndem Kochen mit Ninhydrin. Die Färbung mit Glycin erscheint in der Kälte nach wenigen Minuten, diejenige mit Alanin etwa nach 10 Minuten. Diese Färbungen werden beim Aufbewahren zuerst intensiver, dann aber verblassen sie allmählich und schließlich verschwinden sie gänzlich. Aber nach dem Aufkochen erscheinen sie wieder, beim Aufbewahren verschwinden sie ebenfalls und können nochmals durch Kochen hervorgerufen werden.

Dezinormale Lösungen von Glycin, Alanin und Methylalanin wurden in zugeschmolzenen Gläschen mit Ninhydrinlösung im Wasserbade erwärmt (4 ccm der Aminosäurelösung mit 0,8 ccm 0,2 proz. Ninhydrinlösung). Glycin und Alanin werden nach 2 bis 3 Minuten gefärbt, während beim Methylalanin die Färbung erst nach 2½ Stunden erscheint. Nach vierstündigem Erwärmen im kochenden Wasserbade

werden sämtliche Proben bei Zimmertemperatur aufbewahrt. Nach 4 Tagen sind Glycin- und Alaninlösungen ganz farblos geworden, Methylalaninlösung schwach gelb gefärbt. Nachdem die Gläschen geöffnet waren, erschienen die Färbungen nicht wieder, weder in der Kälte noch nach dem Kochen; aber sie kommen zustande, wenn man neues Triketohydrinden hinzufügt.

Das pigmentbildende Kondensationsprodukt zwischen Ninhydrin und Aminosäure wird auch ohne Luftzutritt bald zersetzt. Die Gegenwart von einer Methylgruppe (Methylalanin), welche einen Wasserstoff in der Aminogruppe besetzt, wirkt störend auf die Pigmentbildung. Die Ester der Aminosäuren geben beim Erwärmen positive Ninhydrinreaktion. Auch Ester methylierten Amino-monocarbonsäuren und Imino-dicarbonsäuren, reagieren mit Ninhydrin z. B. Verbindungen:

$$\begin{array}{l} CH_3 \\ | \\ CH-NH.CH_3 \\ | \\ CO_2.C_2H_5 \end{array} \quad \text{und} \quad \begin{array}{l} CH_3-CH-CO_2.C_2H_5 \\ \qquad | \\ \qquad NH \\ \qquad | \\ CH_3-CH.CO_2.C_2H_5 \end{array} \;;$$

es entstehen aber karminrote Pigmente, welche im Amylalkohol unlöslich sind.

Nach dem Verseifen mit konzentriertem HCl erhält man blaue Pigmente, welche im Amylalkohol löslich sind. Der Ester der Methylasparaginsäure:

$$\begin{array}{l} \qquad\quad NH_2 \\ \qquad\quad | \\ CH_3-C-CH_2-CO_2.C_2H_5 \\ \qquad\quad | \\ \qquad\quad CO_2.C_2H_5 \end{array}$$

reagiert nicht mit Ninhydrin; nach dem Verseifen liefert es Methylasparaginsäure, welche mit Ninhydrin ein blaues, amylalkohollösliches Pigment gibt.

Methyl-(1)-amino-(3)-cyclopentancarbonsäure-(3) zeigt mit Ninhydrin eine violette Färbung, welche in Amylalkohol aufgenommen wird.

$$\begin{array}{l} \qquad CH_3 \\ \qquad | \\ \qquad CH \\ H_2C \diagup \quad \diagdown CH_2 \\ H_2C \text{———} C{<}^{NH_2}_{COOH} \end{array}$$

Es ist wahrscheinlich, daß Triketohydrinden mit verschiedenen Aminosäuren eine Reihe von eigenartigen Kondensationsprodukten bildet, welche verschieden sind von *Ruhemanns* Diketohydrindyliden-diketohydrindamin. Aminosäuren können mit der CO-Gruppe oder der CH . OH-Gruppe des Triketohydrindens durch Vermittlung der

NH_2- bzw. COOH-Gruppen sich kondensieren, und es bilden sich vielleicht esterartige unbeständige Verbindungen, z. B. beim Glycin:

$$C_6H_4\left\langle\begin{matrix}CO\\CO\end{matrix}\right\rangle C{=}N{-}CH_2{-}COO{-}CH\left\langle\begin{matrix}CO\\CO\end{matrix}\right\rangle C_6H_4.$$

Sind aber die Carboxylgruppen esteritiziert und anstatt NH_2-Gruppen NH-Gruppen vorhanden, so entstehen karminrote, amylalkoholunlösliche Kondensationsprodukte folgender Art:

$$C_6H_4\left\langle\begin{matrix}CO\\CO\end{matrix}\right\rangle CH{-\!\!-\!\!-}\begin{matrix}CH_3{-}CH{-}CO_2.C_2H_5\\|\\N\\|\\CH_3.CH{-}CO_2{-}C_2H_5\end{matrix}.$$

Eine genauere Untersuchung und Differenzierung von Aminosäuren-Triketohydrindenpigmenten kann vielleicht von großem Nutzen zur Identifizierung einzelner Aminosäuren in den Fällen sein, wo dieselben in ganz geringen Mengen vorhanden sind[1]).

---

[1]) *E. Herzfeld*, diese Zeitschr. **59**, 249; *J. Harding* und *McLean*, Journ. of biol. Chem. **24**, 503.

Über die Chemie des Pankreas.

Von

Ludwig Petschacher (Innsbruck).

(Aus dem Laboratorium der Ludwig-Spiegler-Stiftung in Wien.)

(Eingegangen am 9. Juli 1923.)

Als im Jahre 1889 durch *v. Mering* und *Minkowski* und, unabhängig von diesen, durch *D. Dominicis* gezeigt wurde, daß nach Exstirpation des Pankreas beim Hunde eine Glykosurie und alle anderen Zeichen eines schweren Diabetes melittus auftraten, wurde die Pathologie und Therapie des menschlichen Diabetes in neue Bahnen gelenkt. Die Entdeckung der genannten Autoren wurde bald von zahlreichen Untersuchern bestätigt und führte zur berechtigten Annahme, daß das Pankreas von allen Organen des tierischen Organismus die größte Bedeutung für den Zuckerstoffwechsel haben müsse.

Minkowski selbst und *Hédon* konnten zeigen, daß weder die Gefäß- und Nervenschädigung, noch der Ausfall der äußeren Sekretion des Pankreas die auslösenden Faktoren beim Zustandekommen des Pankreasdiabetes seien. Hiermit war schon damals der Beweis erbracht, daß dieser Zustand auf den Mangel eines im Pankreas enthaltenen Inkretes zurückzuführen sei. Diese Ansicht fand ihre Bestätigung durch weitere Transplantationsversuche *Minkowskis, Hédons* u. a., sowie durch den interessanten Versuch *Hédons*, bei welchem er die Karotiden eines diabetischen und eines normalen Hundes in Verbindung brachte, und den Parabioseversuch von *Forschbach*, welche zeigten, daß es gelingen könne, die Glykosurie des pankreasektomierten Tieres durch Zufluß von Blut des gesunden zum Schwinden zu bringen. Erst später wurde insbesondere durch *Laguesse* die Aufmerksamkeit auf den Ort der Entstehung dieses Inkretes gelenkt und führte zu der heute wohl allgemein anerkannten Ansicht, daß die *Langerhans*schen Inseln die Bildungsstätte desselben seien. Die Untersuchung des Mechanismus der Wirkung desselben führte sodann zur Aufstellung mannigfaltiger Theorien, auf welche jedoch hier vorläufig nicht eingegangen werden soll.

Seit der Kenntnis aller dieser Tatsachen war das Streben aller Forscher darauf gerichtet, die wirksame Substanz der *Langerhans*schen Inseln als chemisch einheitlichen Körper zu isolieren, in der Hoffnung, daß es mit dessen Hilfe gelingen würde, den Zuckerstoffwechsel experimentell zu beeinflussen und insbesondere den Diabetes beim Menschen wirksam zu

bekämpfen: *Capparelli*, *Battistini*, *Zuelzer* sahen Erfolge nach subkutaner Injektion von Extrakten desselben beim pankreaslosen Tiere und beim menschlichen Diabêtes. Dagegen waren analoge Versuche von *Hédon*, *Gley*, *Lépine*, *Forschbach* u. a. resultatlos. *Leschke* injizierte Extrakt von frischem Pankreas beim Menschen und bei Tieren und beobachtete sogar eine Steigerung der Zuckerausscheidung.

E. L. Scott stellte zwei Extrakte aus Pankreas her: 1. ein alkoholischer Extrakt wurde in folgender Weise bereitet. Frische Pankreas wurden unter Zusatz von Sand und 40proz. Alkohol verrieben, ausgepreßt und der Preßsaft mit so viel absolutem Alkohol versetzt, daß das Gemisch 85 Proz. Alkohol enthielt. Sodann wurde durch 3×24 Stunden bei 35 bis 40° C extrahiert, filtriert und das Filtrat bei 50 mm Hg-Vakuum im Kohlendioxydstrom zur Trockne eingedampft. Die Masse wurde mit Äther extrahiert, sodann in 95proz. Alkohol gelöst und mit Wasser so weit verdünnt, daß 10 ccm der Lösung 1 g Drüse entsprachen. Für den Gebrauch wurde jeweilig abgedampft und in 0,85proz. Kochsalzlösung gelöst. 2. Den wässerigen Extrakt stellte *Scott* in folgender Weise her: Frische Pankreas wurden in derselben Weise wie vorher zuerst mit Alkohol extrahiert und der Rückstand im Vakuum getrocknet, sodann bei 38° C mit absolutem Alkohol nochmals extrahiert und nun mit Wasser durch 1 Stunde 20 Minuten gekocht. Der so erhaltene wässerige Extrakt wurde mit etwas Essigsäure angesäuert, filtriert, eingedampft und für die Aufbewahrung mit Alkohol überschichtet. *Scott* wendete die beiden Extrakte bei pankreasektomierten Tieren an, er erzielte jedoch nur mit dem zweiten wässerigen ein Zurückgehen der Glykosurie. Nach seiner Meinung handelt es sich jedoch dabei um eine toxische Wirkung, welche auch mit gleichartigen Extrakten aus anderen Organen erreicht werden könne.

Allen sah nach parenteraler Zufuhr von Pankreasextrakten keinen Effekt und bezeichnete dieselben sogar als gefährlich.

Murlin und *Kramer* stellten einen Extrakt mit *Ringer*scher Lösung her, welcher mit Salzsäure angesäuert, gekocht, sodann mit Soda neutralisiert und filtriert worden war. Derselbe zeitigte jedoch keinen Effekt auf den Blutzucker. Besser waren die Resultate, wenn außer Pankreas auch Duodenalschleimhaut mit verarbeitet wurde. Sie fanden dann jedoch, daß auch Ringerlösung allein, ja sogar Sodalösung imstande sei, die Glykosurie herabzusetzen. Salzsäure dagegen erhöhte dieselbe, und so kamen die genannten Autoren zum Ergebnis, daß Soda, sei es oral oder intravenös zugeführt, das wirksame Prinzip ihres Extraktes bildete. Diese Ansicht steht in guter Übereinstimmung mit den Untersuchungen von *Elias* über Säurediabetes und von *Underhill*, *Murlin* und *Sweet*, *Murlin* und *Craver*, welche auf die Bedeutung des Säuren-Basengleichgewichtes hingewiesen haben.

Kleiner stellte eine Emulsion aus frischem Hundepankreas in der Weise her, daß er dieselben mit der drei- bis vierfachen Menge destillierten Wassers durch 20 Stunden im Eiskasten extrahierte, dann ausdrückte und durch Tücher seihte. Vor der Injektion wurde diese Emulsion mit der fünffachen Menge 0,9proz. Kochsalzlösung verdünnt. Sie reagierte schwach sauer oder neutral, hatte Rosafarbe und war fast klar. Injektionen von 60 bis 120 ccm dieser Flüssigkeit vermochten den Blutzucker bis auf 0,02 Proz. herabzudrücken, Kontrollversuche mit Emulsionen aus anderen Organen und mit *Ringer*scher Lösung allein zeigten diese Wirkung nicht.

Auch *Paulesco* konnte vor nicht langer Zeit einen Extrakt herstellen, mit welchem es ihm gelang, den Blutzucker zu erniedrigen.

In jüngster Zeit haben amerikanische Forscher neuerlich die Aufmerksamkeit auf das vorliegende Problem gelenkt und sind zu bemerkenswerten Resultaten gekommen. *Banting* und *Best* gingen von der Annahme aus, daß die wirksame Substanz der *Langerhans*schen Inseln durch die im Pankreas enthaltenen Fermente bei der Verarbeitung des Organs zum Teil oder ganz vernichtet würde. Um dies zu vermeiden, unterbanden sie bei Hunden die Ausführungsgänge des Pankreas. Die spätere Untersuchung ergab eine Degeneration des ganzen Pankreasgewebes mit Ausnahme der *Langerhans*schen Inseln, eine Tatsache, welche übrigens schon durch die Versuche von *Laguesse* und *Gontier de la Roche* bekannt war. Die Pankreas dieser Tiere wurden nun in der Kälte mit Ringerlösung extrahiert und der Extrakt intravenös injiziert. Es zeigte sich nun eine deutliche Senkung des Blutzuckerspiegels bei pankreaslosen Tieren und Zurückgehen der Glykosurie derselben. Ähnliche Erfolge hatten diese Forscher auch, wenn sie die Extrakte aus Pankreas von 5 Monate alten Rinderföten, bei welchen die Fermente noch nicht oder nur in geringem Maße vorhanden sind, herstellten. Schließlich jedoch gelang es ihnen, denselben Effekt mit Extrakten von normalen Pankreas erwachsener Tiere hervorzubringen.

Collip teilte sodann ein Verfahren mit, mit Hilfe dessen es gelingt, einen wirksamen Extrakt zu erhalten: Gleiche Mengen von frischem Pankreas und 95proz. Alkohol bleiben mehrere Stunden stehen, während welcher die Mischung öfter aufgeschüttelt wird. Sodann wird koliert und die Flüssigkeit mit der doppelten Menge 95proz. Alkohols versetzt, wodurch es zur Ausfällung des Eiweißes kommt. Nun wird abermals filtriert und die Flüssigkeit im Vakuum bei 18 bis 30° C eingedampft. Der Rückstand wird zweimal mit Äther extrahiert und weiter im Vakuum eingedampft, bis man eine konsistente Paste erhält. Diese wird mit 80proz. Alkohol aufgenommen und zentrifugiert.

Es bilden sich dann vier Schichten. Die oberste klare enthält die wirksame Substanz, die zweite Eiweißkörper, die dritte eine gesättigte Salzlösung, die unterste Kristalle. Die oberste Schicht wird abpipettiert, mit mehreren Volumteilen 95proz. Alkohols oder besser absoluten Alkohols versetzt, wobei eine Fällung entsteht. Der Niederschlag wird abfiltriert und in Wasser zu einer entsprechenden Konzentration gelöst, durch Berkefeldfilter gereinigt und auf Sterilität geprüft. Diese Substanz hat, wie *Banting, Best, Collip, Macleod* und *Noble* in zahlreichen Experimenten zeigen konnten, folgende Wirkung beim Kaninchen: 4 bis 5 ccm subkutan eingespritzt, erzeugen innerhalb 1 bis 4 Stunden einen Abfall des Blutzuckerspiegels bis auf 0,045 Proz., die Tiere werden e regt, äußern Hunger und Durst, bekommen Krämpte und verfallen in einen komatösen Zustand, welcher zum Tode führen kann. Dieser Zustand kann durch intravenöse Injektion von 20proz. Traubenzuckerlösung behoben werden. Die Substanz, von den genannten Autoren *Insulin* genannt, äußert ihre Wirkung auch beim experimentellen Diabetes nach Pankreasektomie beim Zuckerstich, bei der Glykosurie nach Adrenalininjektion, Äthernarkose und Kohlensäureasphyxie. Wurde das Insulin vorher injiziert, so blieb die Hyperglykämie bzw. Glykosurie aus.

Das Insulin zeigt nach *Best* und *Macleod* folgende Reaktionen: Es gibt positive Biuretreaktion, positive Xanthoproteinprobe und positive

*Hopkins-Cole*sche Reaktion. Die Spuren von Eiweiß sind nach der Ansicht der Autoren eine Verunreinigung. Schwaches Erhitzen, besonders bei einer p_H von 5 bis 6, schadet nicht, hingegen wird die Substanz beim Kochen derselben durch länger als 3 Minuten zerstört. Schwache Alkaleszenz schadet nicht. Bei saurer Reaktion wird die Substanz von Kaolin und Tierkohle adsorbiert. Durch Kollodium ist dieselbe nicht durchgängig, ihre Wirksamkeit nimmt jedoch durch Dialyse ab. Auch Passage durch Berkefeldfilter setzt ihre Wirksamkeit herab. Proteolytische Fermente sind nach der Methode von *Sörensen* nicht nachweisbar.

Collip konnte, ausgehend von der Annahme, daß in allen Organismen, in welchen sich Glykogen vorfindet, auch Insulin sich nachweisen lassen müsse, tatsächlich auch aus einer Muschel, Mya arenaria, Insulin darstellen, welches die gleiche Wirksamkeit besitzt.

Nach *McCormick, Macleod, O'Brien* und *Noble* ist der Abfall des Blutzuckers nach Insulin ganz typisch, gleichgültig, welche Nahrung vorher gegeben wurde. Die Tiefe des Abfalls ist abhängig von der Menge des verabreichten Insulins, ist jedoch bei verschiedenen Tieren eine andere. Die Erscheinung beruht nicht auf Glykolyse, da der Versuch in vitro negativ ausfällt, aber auch nicht auf Polymerisation, da der Blutzucker an sich die gleiche Reduktionskraft wie vorher besitzt. Sie nehmen an, daß nach Injektion der Substanz auf irgend eine Weise in den Geweben ein Zuckervakuum entstehe, welches den Blutzucker anziehe, ohne daß Muskeln und Leber mit der Zuckerproduktion nachkommen. Da eine Glykogenzunahme in der Leber von diabetischen Tieren, welche mit Insulin behandelt worden waren, vorzufinden sei, handle es sich vielleicht um eine Polymerisation des Zuckers in den Zellen oder um eine erhöhte Verbrennung, vielleicht auch, wie beim Winterschlaf, um Umwandlung von Kohlenhydraten in Fette.

Banting, Best, Doffin und *Gilchrist* haben 60 nach verschiedener Herstellungsart gewonnene Präparate von Insulin geprüft und konnten große Verschiedenheiten in der Wirksamkeit derselben nachweisen. Nach *Collip* erzeugen manche Präparate nicht nur keine Hypoglykämie, sondern sogar eine Hyperglykämie. Manchmal tritt die Hypoglykämie erst nach 1 bis 4 Tagen auf. Er glaubt, daß es sich um einen komplizierten Vorgang handle, vielleicht um eine Aktivierung des Insulins durch einen anderen Körper der Muttersubstanz. Späterer Eintritt der Hypoglykämie ist vielleicht so zu erklären, daß die Aktivierung erst im Organismus selbst zustande komme.

Macleod berichtet über seine Beobachtungen bei Verabreichung des Insulins an Diabetiker. Wegen der Gefahr etwa auftretender Krämpfe gab er vorher Traubenzuckerinjektionen. Die Wirkung des Insulins dauerte nur einige Stunden an. Es hatte jedoch guten Einfluß auf Körpergewicht und Allgemeinzustand, insbesondere bei den jugendlichen Formen, sowie bei drohendem Koma. *Banting, Campbell* und *Fletcher* behandelten 50 Diabetiker mit Insulin. Sie beobachteten Aufhören der Glykosurie und Ketonurie, Senkung des Blutzuckerspiegels, Rückkehr der Alkalireserve und Kohlensäurespannung des Blutes zu normalen Werten, Ansteigen des respiratorischen Quotienten und Besserung des Allgemeinbefindens. Gegen bedrohliche Hypoglykämie empfehlen sie Verabreichung von Kohlenhydraten und Suprarenininjektionen. *Hepburn* und *Latchford* untersuchten die Wirkung des Insulins bei der Durchspülung des überlebenden Herzens mit glucosehaltiger *Locke*scher Flüssigkeit. Sie bestimmten diejenige

Menge Zucker, welche pro 1 g Herz in der Stunde aus der Spülflüssigkeit verschwindet, und den Glykogengehalt des Herzens vor und nach Zusatz von Insulin. Während ohne Insulinzusatz 0,87 mg Dextrose pro 1 g Herz und Stunde verschwinden, erhöht sich die entsprechende Abnahme nach Insulinzusatz auf 3,06 mg. Der Glykogengehalt des Herzmuskels ändert sich nicht. Sie schließen daraus, daß der Zucker nicht in Glykogen verwandelt wird, sondern in kleinere Moleküle zersplittert oder oxydiert wird. *Collip* versucht eine Erklärung der nach Insulin auftretenden Konvulsionen zu geben. Es kommt vielleicht durch Herabdrücken des Blutzuckerspiegels zu einer Oxydation der Glucose in den Geweben. Es müssen dann Ketonkörper gebildet werden, und das Tier müßte Zeichen von Azidose bieten. Tatsächlich fand er bei einem Blutzuckerspiegel von 0,045 Proz. eine Vermehrung der Acetonkörper und eine Senkung des Kohlensäurebindungsvermögens.

Winter und *Smith* weisen darauf hin, daß der Blutzucker bei gleicher Kristallform und gleichem Reduktionsvermögen eine niedrigere spezifische Drehung als die α- und β-Glykose zeige. Auch nach Aufnahme von Traubenzucker und Fruchtzucker findet sich im Blute immer γ-Glykose. Dem Diabetiker fehlt die Fähigkeit der Umwandlung von α- und β-Glykose in γ-Glykose. Insulin erniedrigt bei 37° C die optische Drehung von Glucose und Fructose. Es handelt sich also hier vielleicht um eine Substanz, welche die Umwandlung der α- und β-Glucose in γ-Glykose vermittle.

Doisy, *Somogyi* und *Shaffer* haben die Darstellungsmethode des Insulins in folgender Weise modifiziert: Zu 1 kg fein zerriebenem Pankreas werden 40 ccm n/10 H_2SO_4 oder 40 ccm konzentrierte HCl, 1200 ccm 95proz. Alkohol und 300 ccm destillierten Wassers zugesetzt. Die Mischung bleibt 4 bis 12 Stunden bei Zimmertemperatur stehen und wird öfter umgerührt, dann durch ein Tuch abgepreßt, nochmals mit 60proz. Alkohol bei Zimmertemperatur extrahiert, abgepreßt und die Flüssigkeiten vereinigt. Der trübe Extrakt wird nun mit Natronlauge bis zur schwachsauren Reaktion versetzt, filtriert und im Vakuum bei 20 bis 30°C so lange abgedampft, bis der Alkohol verschwunden ist. Die so erhaltene Flüssigkeit kommt in einen Scheidetrichter, wird mit Salz- oder Schwefelsäure schwach angesäuert, auf je 100 ccm Flüssigkeit mit 40 g Ammonsulfat versetzt und gut durchgeschüttelt. Nach einigen Stunden setzt sich an der Oberfläche eine Trübung ab, die Flüssigkeit darunter wird abgelassen, die darüber stehende trübe Flüssigkeit filtriert, der Niederschlag getrocknet und mit 75proz. Alkohol (15 ccm für jedes Kilogramm Pankreas) versetzt. Die Mischung wird zentrifugiert, abpipettiert und mit der acht- bis zehnfachen Menge 95proz. oder absoluten Alkohols versetzt, sodann auf eine Wasserstoffzahl von p_H 5 bis 6 gebracht, einige Stunden stehen gelassen und filtriert. Der Niederschlag wird unter Zusatz von etwas Alkali oder Säure in Wasser gelöst und durch wiederholtes Fällen mit Ammonsulfat und Alkohol gereinigt. Man erhält so ein weißes Pulver, das folgende Eigenschaften besitzt: Es enthält ungefähr 14 Proz. N, keinen Phosphor, gibt deutliche Biuret-, schwache Glyoxylsäure-, Schwefelsäure- (*Hopkins-Cole*) und zweifelhafte *Millon*sche Reaktion. Die Lösungen sind schwach linksdrehend. Die Aktivität hält sich bei Kochen in n/10 HCl durch 5 Minuten. Es ist löslich in Wasser außer bei p_H 5 bis 6, bei der es ausfällt. Aus wässerigen Lösungen wird es bei Halbsättigung mit Ammonsulfat gefällt. Es scheint sich um eine Albumose oder ein Globulin zu handeln, möglicherweise enthält es die aktive Substanz nur als Beimischung. Die Wirkungen des so bereiteten

Insulins sind nahezu dieselben wie diejenigen des nach *Collip* hergestellten, wenn auch die Identität der Substanzen selbst nicht festgestellt ist.

Auch *Clough, Stokes, Gibbs, Stone* und *Murlin* haben nach einer eigenen Methode antidiabetische Extrakte aus Pankreas hergestellt und konnten die meisten Symptome nach Pankreasektomie günstig beeinflussen. Es trat Herabsetzung des Blutzuckers und Aufhören der Glykosurie nach zwei bis drei Injektionen ein, der Respirationsquotient wurde höher. Sie nannten ihr Präparat *Glykopyron.* Diese antidiabetische Substanz ist nach *Clyde, Sutter, Gibbs, John* und *Murlin* auch nach Einführung mit der Duodenalsonde in das Duodenum wirksam. Für die Einnahme per os empfehlen sie mit Salol bedeckte Tierkohletabletten, welche die Substanz enthalten, oder gleichzeitige Einnahme von Alkalien. Nach der Ansicht von *Murlin, Kramer* und *Sweet* handelt es sich um einen Körper, welcher die Glykoseassimilation beim diabetischen Tiere wieder herstellt.

Es scheint uns in diesem Zusammenhange wichtig, auch auf andere Mittel hinzuweisen, welche eine Erniedrigung des Blutzuckers herbeizuführen vermögen. *Mering* und *Minkowski* konnten nach Injektion von Phlorrhizin eine Glykosurie beobachten, welche häufig von Hypoglykämie begleitet war. Und *Hédon* und *Lépine* sahen die Blutzucker erniedrigende Wirkung des Phlorrhizins auch an pankreasektomierten Tieren. Die genannten Autoren nahmen an, daß das Phlorrhizin die Zuckerdurchlässigkeit der Niere erhöhe. Auch Phosphor, besonders in Verbindung mit Phlorrhizin, wirkt nach *Frank* und *Isaac* erniedrigend auf den Blutzuckerspiegel. *Underhill* beobachtete nach Injektion von Hydrazinsulfat bei gleichzeitiger Zufuhr von Traubenzucker und bei pankreasektomierten Tieren eine Senkung des Blutzuckers. Über die Wirkung der Injektion von Alkalien berichten *Underhill* und *McDonell* und *Underhill.* Nach *Murlin* und *Kramer* und *Kramer* und *Marker* sind Alkalien jedoch ohne Einfluß auf den Blutzucker bei normalen Tieren. *Underhill* konnte sodann zeigen, daß bei langsamer prolongierter intravenöser Zufuhr von großen Gaben Soda es dennoch gelinge, auch beim normalen Tiere eine Hypoglykämie zu erzeugen. *Macleod* und *Fulk,* welche die Wirkung der Alkalien bestätigen konnten, brachten diese Tatsache in Zusammenhang mit der Wichtigkeit des Säuren-Basengleichgewichts für den intermediären Zuckerstoffwechsel überhaupt. Nach Leberexstirpation beobachteten *Macleod* und *Pearce* Hypoglykämie. Wie *Mann* und *Magath* zeigen konnten, kommt es dabei zu Schwächezuständen und zu Koma, welche durch Zufuhr von Glucose, Galaktose oder Maltose hintangehalten werden können. Hypoglykämie tritt ferner auf im Gefolge einer alimentären Glykosurie (*Folin* und *Bergl* und *MacLean, Wesselow*) und von Adrenalinglykosurie (*Vosburg* und *Richards*) und nach der Hyperglykämie infolge von Glucoseinjektionen (*Bang*).

Es ist nicht beabsichtigt, hier auf den Mechanismus einzugehen, welcher bei der Anwendung aller dieser Mittel die Hypoglykämie herbeiführt. Wir wissen, daß die Vorgänge, welche zu einer Änderung des Blutzuckerspiegels führen, bei weitem noch nicht geklärt sind. Drei Faktoren sind es vor allem, welche hierfür in Betracht kommen und welche wohl meistens gleichzeitig den intermediären Zuckerstoffwechsel beeinflussen. Es sind dies die Zuckerabgabe in das Blut, der Zuckerverbrauch im Organismus und die Durchgängigkeit der Nieren für den Zucker. Störungen auch nur auf einem dieser Gebiete werden selbstverständlich zu einer Änderung des Blutzuckerspiegels führen und die Mittel, welche eine Hypoglykämie

herbeiführen, werden in analoger Weise derart wirken, daß sie einen der drei Faktoren oder auch mehrere beeinflussen.

Bei der Therapie des menschlichen Diabetes haben die zuletzt angeführten Mittel wenig Erfolg gezeitigt, wenn wir etwa von der Wirkung der Alkalien absehen wollen, welche freilich, oft von ganz anderen Gesichtspunkten aus, schon seit langer Zeit insbesondere in Form der Karlsbader Kur eine Rolle bei der Behandlung der Zuckerkrankheit gespielt haben (ausführliche Literatur bei *v. Noorden*). Die übrigen Mittel kommen wegen ihrer toxischen, ja meist deletären Wirkung überhaupt nicht in Betracht. Die Therapie mit Hilfe von Organextrakten hat bis in die letzte Zeit keine Erfolge aufweisen können, erst die letzten Veröffentlichungen der amerikanischen Gelehrten über die Anwendung des Insulins beim Diabetes lassen uns Hoffnung schöpfen, daß vielleicht doch von dieser Seite noch etwas zu erwarten sei.

Noch vor dem Bekanntwerden der Erfolge der amerikanischen Forscher mit Insulin sind wir der Frage näher getreten, ob es nicht vielleicht doch möglich sei, unter gewissen Bedingungen die wirksame Substanz des Pankreasinkretes aufzufinden. Zu diesem Zwecke erschien es uns wichtig, die gesamte Chemie des Pankreas zu erforschen. Wir wählten dabei einen Weg, auf welchem es gelingen könnte, alle im Pankreas befindlichen Substanzen voneinander zu isolieren, zu untersuchen und sodann am Tierexperiment ihre Wirkung zu erforschen. Nach mannigfaltigen Vorversuchen erschien uns die im folgenden geschilderte Methode hierfür die geeignetste.

Wir wählten für die Verarbeitung Pankreas von Pferden, da dieselben leicht zu beschaffen waren und wenig Fett aufwiesen. 2 kg frische Pferdepankreas wurden mechanisch von Fett befreit, fein gehackt, mit 3 Litern 96proz. Alkohols versetzt und unter zeitweiligem Umrühren 24 Stunden im Eiskasten stehen gelassen. Sodann wurde koliert. Der Rückstand wurde noch zweimal in der gleichen Weise behandelt und schließlich mit 1½ Litern 96proz. Alkohols durch 2 Stunden am Rückflußkühler gekocht und wieder koliert. Die Extrakte wurden vereinigt und im Vakuum bei 20 mm Hg eingeengt, bis der Alkohol vertrieben war. Die extrahierten Organe wurden nun mit 2 Liter Wasser durch 3 Stunden gekocht, koliert und der wässerige Extrakt mit dem anderen vereinigt. Die Organrückstände wurden sodann verworfen, der Extrakt, eine bräunliche, trübe Flüssigkeit, durch Faltenfilter filtriert. Hierbei erwies es sich als notwendig, die Faltenfilter häufig zu wechseln, da sich die Poren sehr bald verlegten. Es gelang so, eine klare, braune Flüssigkeit zu erhalten, welche durch Ausschütteln mit Petroläther von etwa noch darin enthaltenem Fett befreit wurde. Der Extrakt wurde sodann im Vakuum bei 20 mm Hg auf etwa ½ Liter eingeengt, nach dem Abkühlen mit 96proz. Alkohol aufgenommen und so lange mit 96proz. Alkohol versetzt, als noch eine Fällung zu erzielen war. Hierzu waren ungefähr 3 Liter Alkohol nötig.

Nach 24stündigem Stehen setzte sich am Boden ein zäher, teigiger Niederschlag ab. Die darüber stehende alkoholische Lösung wurde dekantiert und der Rückstand noch mit Alkohol ausgeholt. Der teigige Niederschlag erwies sich als löslich im Wasser und gab starke Biuretreaktion. Die alkoholische Flüssigkeit wurde im Wasser bei 20 mm Hg vorsichtig eingedampft, bis sie sich durch Ausfallen eines Niederschlages trübte. Nach 24 Stunden hatte sich dieser Niederschlag als kristallinisches, weißes Pulver abgesetzt und konnte auf einer kleinen Porzellannutsche abgesogen werden. Die Kristalle wurden mit etwas 96proz. Alkohol gewaschen und aus heißem Wasser unter Verwendung von etwas Tierkohle fünfmal umkristallisiert. Die Substanz zeigte sodann einen konstanten Schmelzpunkt und kam zur Untersuchung. Die Gesamtausbeute betrug etwa 0,5 g (Substanz I).

Das Filtrat wurde sodann in der oben beschriebenen Weise eingeengt und mit basisch essigsaurem Blei ausgefällt. Nach 24 Stunden wurde filtriert, der Niederschlag mit verdünnter basischer Bleiacetatlösung gewaschen und Filtrat (II) und eine Aufschwemmung des Niederschlages (III) mit Schwefelwasserstoff zerlegt. Sodann wurde filtriert, der Schwefelwasserstoff durch Luft vertrieben, die Flüssigkeiten etwas eingeengt, mit Bariumcarbonat bis zum Verschwinden der Kongoreaktion versetzt und filtriert. Flüssigkeit II wurde im Vakuum auf etwa 50 ccm eingedampft und mit 2 Litern 96proz. Alkohols versetzt. Es entstand eine dichte milchige Trübung, welche nach 24 Stunden sich als klebriger, harzartiger Niederschlag am Boden des Gefäßes absetzte. Die überstehende Flüssigkeit wurde dekantiert, filtriert und der Niederschlag mit 96proz. Alkohol ausgeholt. Der Niederschlag (IV) wurde in wenig heißem Wasser gelöst, das Filtrat (II) im Vakuum vorsichtig eingedampft, bis man eine Ausfällung bemerkte. Nach 24 Stunden hatte sich ein weißes kristallinisches Pulver abgesetzt, welches auf einer Nutsche abgesogen, mit etwas Alkohol gewaschen und durch wiederholtes Lösen im Wasser und Ausfällen mit 96proz. Alkohol bis zum konstanten Schmelzpunkt gereinigt wurde (Substanz V). Flüssigkeit II wurde weiter im Vakuum eingeengt, bis sich abermals eine Trübung zeigte, welche sich nach 24 Stunden ebenfalls als kristallinisches Pulver absetzte und in gleicher Weise wie Substanz V behandelt wurde.

Die übrige Flüssigkeit II wurde nun im Vakuum zur Konsistenz eines dicken Sirups eingeengt und mit Alkohol aufgenommen, wobei keine Fällung mehr entstand. Die alkoholische Flüssigkeit wurde sodann mit einer alkoholischen Lösung von Merkuriacetat ausgefällt, nach Absitzen des Niederschlages filtriert und das Filtrat nochmals mit alkoholischer Sublimatlösung ausgefällt. Der mit Mercuriacetat erhaltene Niederschlag (VII) und der mit Sublimat erhaltene Nieder-

schlag (VIII) sowie das Filtrat (II) wurden mit Schwefelwasserstoff zerlegt. Die Flüssigkeiten wurden sodann filtriert und der Schwefelwasserstoff durch Luft vertrieben. Flüssigkeit VII wurde weiter eingedampft und nach dem Abkühlen mit 96proz. Alkohol in Überschuß versetzt. Es setzte sich nach mehreren Stunden am Boden ein schmieriger Niederschlag ab, von welchem die darüber stehende Flüssigkeit dekantiert wurde. Der Niederschlag wurde im Wasser gelöst (VII), das Filtrat mit 10proz. Schwefelsäure ausgefällt. Nach 24 Stunden hatte sich am Boden des Gefäßes ein gelber kristallinischer Niederschlag abgesetzt (IX), von welchem die überstehende Flüssigkeit (X) dekantiert wurde. Flüssigkeit II und VIII wurden mit Bleiglätte bis zum Verschwinden der Kongoreaktion versetzt, filtriert, die Filtrate abermals mit Schwefelwasserstoff zerlegt, wieder filtriert, sodann der Schwefelwasserstoff durch Luft vertrieben und mit Silbercarbonat bis zum Verschwinden der Kongoreaktion versetzt, filtriert und eingeengt. Flüssigkeit II ergab auf Zusatz von Alkohol eine Trübung, welche sich nach 24 Stunden als feiner Niederschlag (IIa) absetzte. Das Filtrat (II) wurde eingeengt und gab auf weiteren Zusatz von Alkohol keinen Niederschlag mehr. Flüssigkeit VIII ergab ebenfalls mit Alkohol einen feinen Niederschlag (XI), von welchem abfiltriert wurde.

Flüssigkeit IV wurde mit wässeriger Sublimatlösung ausgefällt und filtriert. Nach 24 Stunden setzte sich im Filtrat abermals ein Niederschlag ab, von welchem abfiltriert wurde. Die beiden Niederschläge (VI und VIa), sowie auch das Filtrat (IV) wurden sodann mit Schwefelwasserstoff zerlegt und in der schon beschriebenen Weise ebenso wie Flüssigkeit VIII noch mit Bleiglätte und Silbercarbonat usw. behandelt.

Die Elementaranalyse der Substanz nach dem Mikroverfahren von *Pregl* hatte folgendes Ergebnis:

1,991 mg Substanz gaben bei 12° C und 750 mm Hg 0,222 ccm N oder 13,18 Proz. N.

3,329 mg Substanz gaben bei 19° C und 750 mm Hg 0,367 ccm N oder 12,94 Proz. N.

5,804 mg Substanz gaben 11,07 mg CO_2 und 5,03 mg H_2O, d. i. 52,03 Proz. C und 9,70 Proz. H,

6,168 mg Substanz gaben 11,769 mg CO_2 und 5,377 mg H_2O, d. i. 52,05 Proz. C und 9,76 Proz. H.

Berechnet für $C_{14}H_{31}N_3O_5$		Gefunden	
C.	52,30 Proz.	52,03	52,05
H	9,72 „	9,70	9,76
N	13,08 „	13,18	12,94

Cl, P, S nicht nachweisbar.

Die Substanz zeigte folgende Reaktionen. In wässeriger Lösung reagierte sie gegen Lackmuspapier neutral, aus Alkohol kristallisierte

sie in zarten kurzen Prismen aus. Die Bestimmung des Schmelzpunktes in der Kapillare ergab Schmp. = 265° C. Mit *Millons* Reagens gab sie keine Rotfärbung, ebenso war die Xanthoproteinreaktion negativ. *Mörners* Reagens gab keine Grünfärbung, die Glyoxylsäurereaktion nach *Hopkins-Cole* war auch negativ. Sie drehte das polarisierte Licht schwach nach links.

Für den Tierversuch wurde die Substanz in destilliertem Wasser gelöst, im Wasserbade sterilisiert und in die Ohrvene vom Kaninchen injiziert. Vor der Injektion, nach 2 bis 4 Stunden wurde der Blutzucker nach einem von mir modifizierten Verfahren nach dem Prinzip der *Bang*schen Mikromethode unter Verwendung von je 2 ccm Blut aus der Ohrvene des Kaninchens bestimmt. Zur Vermeidung größerer Blutverluste wurde die Blutentnahme in der Weise gemacht, daß eine Platiniridiumkanüle, welche durch einen kurzen Gummischlauch mit einer mit einigen Kristallen Natriumcitrat beschickten 2-ccm-Pipette in Verbindung stand, in die Ohrvene eingestochen wurde und nur gerade die notwendige Menge Blut entnommen wurde. Das Ergebnis war folgendes:

K. 19a, Substanz I, 0,01 g intravenös.

Vor der Injektion	0,113 Proz.
2 Stunden nachher	0,121 „
4 „ „	0,165 „

Substanz I, 0,02 g intravenös.

Vor der Injektion	0,126 Proz.
2 Stunden nachher	0,175 „
4 „ „	0,156 „

Substanz I, 0,04 g intravenös.

Vor der Injektion	0,145 Proz.
2 Stunden nachher	0,160 „
4 „ „	0,151 „

Größere Mengen konnten vorläufig wegen der geringen Menge der bisher zur Verfügung stehenden Substanz nicht verwendet werden. Doch ist wohl kaum anzunehmen, daß dieselben eine andere Wirkung auf den Blutzuckerspiegel haben würden, da wir von einem Hormon eher bei geringeren Dosen bereits eine Wirksamkeit erwarten müßten. Die Tiere zeigten auch sonst kein abnormes Verhalten.

Substanz V erwies sich bei der Untersuchung als unreines l-Leucin ($C_6H_{13}O_2N$). Die Elementaranalyse ergab jedoch keine ganz genaue Übereinstimmung mit den geforderten Werten, und auch der Schmelzpunkt in der geschlossenen Kapillare lag etwas tiefer. Auch nach wiederholtem Umkristallisieren ließ sich keine Übereinstimmung erreichen.

Doch waren die Reaktionen sonst für Leucin charakteristisch.

Substanz Va erwies sich ebenfalls als l-Leucin, war jedoch reiner als Substanz V.

Das Tierexperiment mit diesen beiden Substanzen in analoger Weise wie früher angestellt, hatte folgendes Ergebnis:

K. II, Substanz V, 0,1 g intravenös.

Vor der Injektion	0,180 Proz.
2 Stunden nachher	0,151 „
4 „ „	0,126 „

K. 18c, Substanz Va, 0,1 g intravenös.

Vor der Injektion	0,165 Proz.
2 Stunden nachher	0,156 „
4 „ „	0,141 „

Ein Kontrollversuch mit einem Leucinpräparat der Firma Grübler ergab K. 3 l-Leucin, 0,2 g intravenös.

Vor der Injektion	0,145 Proz.
2 Stunden nachher	0,219 „
4 „ „	0,229 „

In keinem der Fälle war im Verhalten der Tiere sonst etwas Merkwürdiges zu beobachten.

Aus den im vorstehenden wiedergegebenen Zahlen ist ersichtlich, daß mit Substanz V eine *Senkung* des Blutzuckerspiegels um 30 Proz. erfolgte. Substanz Va zeigte keine so merkliche Beeinflussung, Leucin jedoch sogar eine deutliche *Erhöhung*. Aus diesen Ergebnissen läßt sich der Schluß ziehen, daß Substanz V und vielleicht in geringerem Maße auch Substanz Va als Verunreinigung einen den Blutzuckergehalt erniedrigenden Körper enthalten. Der Verdacht hierfür verstärkt sich durch die Tatsache, daß reines Leucin den Blutzuckerspiegel sogar deutlich erhöhte. Es ist daher nicht verwunderlich, daß bei der Suche nach dem Inkret des Pankreas einzelne Forscher Extrakte erhalten haben, welche zu einer *Erhöhung* des Blutzuckerspiegels führten. Vielleicht enthält auch das Insulin von *Collip* und seinen Mitarbeitern noch Leucin und Substanz I. Bei Ausschaltung derselben ließe sich vielleicht die Wirkung des Insulins erhöhen. Weitere Untersuchungen sollen darauf gerichtet sein, Klärung zu bringen, und insbesondere wird es von Wichtigkeit sein, ob sich die wirksame Substanz auch in den anderen noch nicht näher untersuchten Fraktionen befindet.

Literatur.

Allen zit. nach *Kleiner*. — *Bang*, Der Blutzucker. Wiesbaden 1913. — *Banting*, Amer. Journ. of Phys. **59**, 479, 1922. — *Banting* und *Best*, Journ. of Labor. a. clin. Med. **7**, 251 und 464, 1922. — *Banting, Best, Collip, Macleod, Noble*, Amer. Journ. of Phys. **62**, 162 und 559, 1922. — *Banting, Best, Doffin, Gilchrist*, ebendaselbst **63**, 391, 1923. — *Banting, Campbell, Fletcher*, Brit. med. Journ. **1**, 8, 1923. — *Battistini*, Therap. Monatsschr. 1893, S. 494. — *Best* und *Macleod*, Journ. of biol. Chem. **29**, 55, 1923. — *Biedl*, Innere Sekretion, bei Urban und Schwarzenberg, 1916. — *Capparelli*, Biol. Zentralbl. 1893, S. 495. — *Clough, Stokes, Gibbs, Stone, Murlin*, Journ. of biol. Chem. **30**, 55, 1923. — *Clyde, Sutter, Gibbs, John, Murlin*, Amer. Journ. of Phys. **63**, 389, 1923. — *Collip*, Proc. Roy. Soc. Cand. 1922. — *Derselbe*, Journ. of biol. Chem. **38**, 55, 1923; **40**, 55, 1923. — *Derselbe*, Amer. Journ. of Phys. **63**, 391, 1923. — De Dominicis Giorn. int. dell. scienz. med. 1889, S. 801. — *Doisy, Somogyi, Shaffer*, Journ. of biol. Chem. **31**, 55, 1923. — *Elias*, diese Zeitschr. **48**, 120, 1912/13. — *Folin* und *Bergl*, Journ. of biol. Chem. **51**, 213, 1922. — *Forschbach*, Deutsch. med. Wochenschr. 1908, 1909. — *Frank* u. *Isaac*, Arch. f. exper. Path. u. Pharm. **64**, 293, 1911. — *Gley*, Arch. der

phys. norm. et path. 1892, S. 753. — *Hédon*, Diabéte pancreatique. Paris 1898. — *Derselbe*, C. r. soc. biol. **66**, 609,1909; **67**, 792, 1909. — *Derselbe*, Rev. d. med. 1910, S. 619. — *Derselbe*, C. r. soc. biol. **71**, 124, 1911. — *Hepburn*, *Latchford*, Amer. Journ. of Phys. **62**, 177, 1922. — *Kleiner*, Journ. of biol. Chem. **40**, 153, 1919. — *Kramer* und *Marker*, ebendaselbst **27**, 481, 1916. — *Laguesse*, Le pancréas. Lyon 1906. — *Laguesse* et *Gontier de la Roche*, C. r. soc. biol. 1902, S. 584. — *Lépine*, Le diabete sucré. Paris 1909. — *Leschke*, Münch. med. Wochenschr. 1911, S. 3034. — *McCormick*, *Macleod*, *O'Brien*, *Noble*, Amer. Journ. of Phys. **68**, 389, 1923. — *MacLean*, *Wesselow*, Quart Journ. med. **14**, 103, 1921. — *Macleod*, Brit. med. Journ. **2**, 833, 1922. — *Macleod* und *Fulk*, Amer. Journ. of Phys. **48**, 193, 1917. — *Macleod* und *Pearce*, ebendaselbst **32**, 184, 1913. — *Mann* und *Magath*, ebendaselbst **55**, 285, 1921. — *Mering* und *Minkowski*, Zentralbl. f. klin. Med. 1889, S. 393. — *Dieselben*, Arch. f. exper. Path. u. Pharm. **26**, 1890. — *Minkowski*, ebendaselbst **31**, 1893. — *Derselbe*, ebendaselbst **53**, 331, 1905. — *Murlin* und *Cramer*, Journ. of biol. Chem. **15**, 365, 1913; **27**, 481 und 517, 1916; **28**, 289, 1917. — *Murlin*, *Cramer* und *Sweet*, Journ. f. med. res. 1922. — *Murlin* und *Sweet*, Journ. of. biol. Chem. **28**, 261, 1917. — *v. Noorden*, Die Zuckerkrankheit und ihre Behandlung. Berlin bei Aug. Hirschwald, 1917. — *Paulesco*, C. r. soc. biol. **85**, 555, 1921. — *Pflüger*, Pflügers Arch. **118**, 267, 1907. — *E. L. Scott*, Amer. Journ. of Phys. **29**, 306, 1911/12. — *Underhill*, Journ. of biol. Chem. **10**, 199 u. 271, 1911. — *Derselbe*, Proc. soc. exper. biol. Med. 1916. — *Derselbe*, Journ. of biol. Chem. **25**, 447 und 463, 1916. — *Derselbe*, Journ. Amer. med. assoc. **68**, 497, 1917. — *Underhill* und *McDonell*, Journ. of biol. Chem. **29**, 227, 1917. — *Vosburg* und *Richards*, Amer. Journ. of Phys. **9**, 35, 1903. — *Winther* und *Smith*, Brit. med. Journ. **1**, 12, 1923. — *Zuelzer*, Zeitschr. f. exper. Path. u. Ther. **5**, 1908.

Untersuchungen über die Wirkung des Thyroxins.

2. Mitteilung.

Über die Wirkung des Thyroxins auf Froschlarven[1]).

Von

B. Romeis.

(Aus dem histologisch-embryologischen Institut der Universität München.)

(Eingegangen am 10. Juli 1923.)

Mit 13 Abbildungen im Text.

Im ersten Teil der vorliegenden Studien über das Thyroxin[2]) wurde der Nachweis erbracht, daß dasselbe bei weißen Mäusen ebenso wie die Verfütterung frischer Schilddrüse zu starker Abnahme des Körpergewichtes, zu starker nervöser Erregung und schließlich zum Tode führt. Auch in der Wirkung auf das Leberglykogen besteht zwischen Thyroxin und Schilddrüsensubstanz weitgehende Übereinstimmung: schon Bruchteile eines Milligramms sind hinreichend, um die Leber der Maus mehr oder weniger glykogenfrei zu machen.

In einer kurzen Mitteilung[3]) berichtete ich ferner über die starke spezifische Wirksamkeit des Thyroxins im Kaulquappenversuch. Bei der Fortsetzung dieser Versuche konnten weitere Ergebnisse gewonnen werden, weshalb ich in vorliegender Arbeit noch eingehender darüber berichten möchte.

Methodik.

Die Versuchstechnik hielt sich im allgemeinen an die von mir im Handbuch der biochemischen Arbeitsmethoden[4]) niedergelegten Angaben. Von der Verwendung des Piscidins zur Fütterung der Tiere bin ich jedoch seit einiger Zeit abgekommen. Vergleiche zwischen dem Piscidin aus den Jahren 1914 und 1915 mit dem seit den letzten Jahren erhältlichen ergaben nämlich, daß sich die Zusammensetzung desselben unvorteilhaft verändert hat. Es ist allem Anschein nach für die Ernährung der Tiere nicht mehr voll ausreichend. Zudem besteht bei der Piscidinfütterung der Nachteil, daß einzelne, für die Froschlarven unverdauliche beigemengte Bestandteile sich

---

[1]) Ausgeführt mit Unterstützung der Notgemeinschaft deutscher Wissenschaft.

[2]) *B. Romeis*, diese Zeitschr. **135**, 85—106, 1923.

[3]) *Derselbe*, Klin. Wochenschr. 1, 1262, 1923.

[4]) *Derselbe*, Methodik des Kaulquappenversuchs. Handbuch der biochemischen Arbeitsmethoden, 1922.

später bei der Anfertigung von Schnittserien zur mikroskopischen Untersuchung infolge ihrer Härte sehr unangenehm bemerkbar machen. Aus diesen Gründen wurden die Larven in den vorliegenden Versuchen mit frischem oder gekochtem Muskelfleisch gefüttert. Verabreicht man nur kleine Mengen, so kann das Wasser ohne Schädigung der Tiere 3 bis 4 Tage lang ohne Erneuerung in den Schalen stehen bleiben. In jeder Schale befindet sich außerdem reichlich Quellmoos, das alle 3 bis 4 Wochen durch neues zu ersetzen ist. Für die Dauer der Einwirkung der einzelnen Lösungen wird von der Einlage von Pflanzen abgesehen. Das Photographieren der Tiere nehme ich jetzt nur mehr bei künstlichem Licht vor. Zur Beleuchtung dient eine mit Reinlichtkugel versehene Reflektorlampe, die so schönes gleichmäßiges Licht gibt, daß eine Gegenbeleuchtung unnötig ist: Als Unterlage der mit Wasser gefüllten Petrischale, in der sich die durch Zusatz von Chloroformwasser narkotisierten Tiere befinden, dient eine 1 cm dicke Glasplatte, deren Oberfläche mattiert ist. Unter die Glasplatte kommt ein Blatt weißes Papier. Man vermeidet auf diese Weise jede Schlagschattenbildung. Die Tiere liegen scharf konturiert auf weißem Untergrund.

Die Ausmessung der Tiere erfolgt durch Auflegen eines Glasmikrometers auf die Lichtbilder. Zum Ablesen der Werte wie auch zum Betrachten der Bilder benutzte ich die ausgezeichnete binokulare Präparierlupe von *Leitz*, deren großes Gesichtsfeld dabei sehr vorteilhaft ist.

Das in den Versuchen verwendete Thyroxin stammt von Squibbe & Co.; ich verdanke es der Liebenswürdigkeit Herrn Dr. *Uhlenhuths* in New York. Das Jodthyreoglobulin wurde genau nach der Vorschrift *Oswalds*[1]) hergestellt. Das Dijodtyrosin und Jodthyreoglobulin wurde mir in dankenswerter Weise von den vereinigten Farbwerken Bayer-Elberfeld zur Verfügung gestellt. Die einzelnen Substanzen kamen stets in völliger Lösung zur Einwirkung. Zur Herstellung der Thyroxinlösung wurden 2 mg in 10 ccm destilliertem Wasser fein verrieben und durch Zusatz von 0,4 ccm n/1 NaOH zu klarer Lösung gebracht, die mit destilliertem Wasser auf 100 ccm aufgefüllt wurde. Bei den übrigen Substanzen wurde von 20 mg Substanz ausgegangen. Von diesen Stammlösungen wurden dann entsprechende Verdünnungen bereitet.

Versuchsprotokoll 578.

Material: Rana temporaria-Larven aus einem am 15. März 1922 im Freien abgelegten Laichballen.

Beginn des Versuchs: 27. März 1922. Alter der Tiere: 12 Tage.

Entwicklungsstadium: Die äußeren Kiemen sind seit einem Tag überwachsen. Die Extremitätenanlagen sind noch nicht sichtbar.

Anzahl der Tiere: 17 Gruppen zu je 20 Larven. Die Anzahl vermindert sich aber in etwa 3 Wochen in allen Gruppen infolge der vorgenommenen Fixierungen auf 10 bis 13 Larven.

Versuchsanordnung.

Gruppe	a:	Kontrolle.	
,,	b:	Thyroxin	1: 1000000
,,	c:		1: 10000000
,,	d:	,,	1: 100000000
,,	e:	,,	1: 1000000000

[1]) *A. Oswald*, Die Schilddrüse in Physiologie und Pathologie. Leipzig 1916, Veit & Co.

Gruppe	f:	Dijodtyrosin	1: 100000
,,	g:	,, ...	1: 1000000
,,	h:	,, ...	1: 10000000
,,	i:	,, ...	1:100000000
,,	k:	Jodothyrin	1: 100000
,,	l:	,, ...	1: 1000000
,,	m:	,, ...	1: 10000000
,,	n:	,, ...	1:100000000
,,	o:	Jodthyreoglobulin. . . .	1: 100000
,,	p:	,, ...	1: 1000000
,,	qu:	,, ...	1: 10000000
,,	r:	,, ...	1:100000000

Die Einwirkung der einzelnen Lösungen erfolgt nur zweimal, und zwar das erste Mal 48 Stunden, das zweite Mal 24 Stunden lang. Die Wassermenge in den einzelnen Schalen beträgt an diesen Tagen je 500 ccm, während der ganzen übrigen Versuchszeit dagegen je 1000 ccm. Im einzelnen nahm der Versuch folgenden Verlauf:

27. März 1922. Erste Einwirkung der Lösungen.

29. März. Wasserwechsel. — 30. März. Desgleichen.

31. März. Zweite Einwirkung der Lösungen. Die Tiere in Gruppe b sind etwas kleiner als die der übrigen Gruppen.



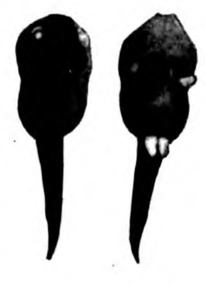


Abb. 1a u. 1b Abb. 2a u. 2b

Abb. 1 u. 2, Versuch 573. 21 tägige Kaulquappen dorsal und ventral gesehen, aufgenommen am 5. 4. 1922. Vergr. 1:4. 1a u. 1b Kontrollarve aus Gruppe a; 2a u. 2b Gruppe b, Thyroxin 1:1000000 (2×).

1. April. Wasserwechsel. Das Wachstum der Kaulquappen von Gruppe b und c ist nun sehr deutlich gehemmt. Auch in Gruppe f bleiben die Tiere zurück. Aus jeder Gruppe werden je zwei Tiere fixiert (Nr. 3400 bis 3433).

2. April. Fixierung: Gruppe a: Nr. 3450 (40 mg); Gruppe b: Nr. 3451, Nr. 3452 (20 mg).

3. April. In Gruppe b kommt die typische Schilddrüsenwirkung nun voll zum Ausdruck. Beschleunigte Entwicklung der Extremitäten, Abwurf der Hornkiefer, Reduktion des Schwanzes, Stillstand des Körperwachstums, Verkürzung des Darms usw. ist festzustellen. Schwächer treten die Erscheinungen in Gruppe c hervor. Die übrigen Gruppen zeigen gegenüber der Kontrolle noch keine wesentlichen Unterschiede. Fixierung: Gruppe b: Nr. 3453, 3454.

4. April. Weitere Verstärkung der Schilddrüsenerscheinungen in Gruppe b. In der Nacht vom 4. auf den 5. April sterben zehn Tiere dieser

Tabelle I.

Gesamtlänge	Rumpflänge	Rumpfbreite	Schwanzlänge	Gesamtlänge	Rumpflänge	Rumpfbreite	Schwanzlänge	Gesamtlänge	Rumpflänge	Rumpfbreite	Schwanzlänge
Gruppe a: Kontrolle				Gruppe b: Thyroxin 1:1000000				Gruppe c: Thyroxin 1:10000000			
15,6	5,6	3,5	10,0	8,2	4,0	2,8	4,2	12,0	4,4	2,8	7,6
16,0	6,0	3,8	10,0	8,6	4,4	3,0	4,2	12,0	4,5	2,9	7,5
16,5	6,2	4,0	10,3	9,0	4,7	2,9	4,3	13,5	4,0	3,1	9,5
16,6	6,1	3,9	10,5	9,5	4,6	2,8	4,9	14,0	4,8	3,0	9,2
16,7	6,1	4,0	10,6	9,8	4,5	2,8	5,3	14,0	4,8	3,0	9,2
16,7	6,3	4,0	10,4	10,7	4,7	3,0	6,0	14,0	5,0	3,1	9,0
17,0	6,2	3,8	10,8					14,5	5,0	3,0	9,5
17,0	6,2	3,9	10,0					14,5	5,4	3,2	9,1
17,1	6,6	4,1	10,5					14,9	5,1	3,0	9,8
17,5	6,6	4,4	10,9					15,7	5,7	3,5	10,0
18,0	6,5	4,0	11,5					16,0	5,0	3,2	11,0
								16,0	5,5	3,5	10,5
16,8	6,2	3,9	10,6	9,3	4,5	2,9	4,8	14,2	4,9	3,1	9,3
Gruppe d: Thyroxin 1:100000000				Gruppe e: Thyroxin 1:1000000000				Gruppe f: Dijodtyrosin 1:100000			
14,5	5,4	3,1	9,1	15,0	5,8	3,5	9,2	15,5	5,2	3,5	10,3
15,0	5,5	3,5	9,5	15,6	5,7	3,9	9,9	15,6	5,2	3,5	10,4
15,0	5,5	3,5	9,5	17,0	6,0	3,8	11,0	16,0	5,5	3,5	10,5
15,1	5,5	3,5	9,6	17,0	6,0	4,0	11,0	16,0	5,6	3,5	10,4
15,6	5,6	3,7	10,0	17,0	6,1	3,6	10,9	16,1	5,7	3,6	10,4
16,0	5,7	3,5	10,3	17,0	6,3	3,9	10,7	16,3	5,5	3,5	10,8
16,6	5,8	3,5	10,2	17,0	6,2	4,0	10,8	16,5	5,6	3,6	10,9
16,4	6,0	3,7	10,4	17,0	6,5	3,7	10,5	16,5	5,6	3,5	10,9
16,5	6,0	3,9	10,5	18,0	6,5	4,0	11,5	16,5	5,6	3,6	10,9
16,5	6,2	3,9	10,3	18,0	6,5	4,0	11,5	16,6	5,7	3,7	10,9
16,5	6,2	4,0	10,3	18,1	6,7	4,0	11,4	17,2	6,0	3,6	11,2
17,0	6,5	4,0	10,5	18,5	7,0	4,2	11,5	18,2	6,1	4,0	12,1
15,8	5,8	3,6	10,0	17,1	6,3	3,9	10,8	16,4	5,6	3,6	10,8
Gruppe g: Dijodtyrosin 1:1000000				Gruppe h: Dijodtyrosin 1:10000000				Gruppe i: Dijodtyrosin 1:100000000			
15,6	5,6	3,5	10,0	15,0	5,5	3,6	9,5	15,7	6,0	3,9	9,7
16,2	6,0	3,8	10,2	15,5	5,5	3,5	10,0	16,5	6,0	3,8	10,5
16,5	6,0	3,8	10,5	16,0	6,0	3,6	10,0	16,5	6,0	3,9	10,5
16,5	6,0	3,9	10,5	16,0	5,8	3,8	10,2	16,8	6,2	3,9	10,6
16,6	6,0	3,8	10,6	16,5	6,0	3,7	10,5	17,0	6,4	4,0	10,6
16,7	6,2	3,9	10,5	16,5	6,0	4,0	10,5	17,0	6,5	4,0	10,5
16,8	6,0	3,7	10,8	16,5	6,0	4,0	10,5	17,0	6,5	4,0	10,5
17,0	6,0	3,9	11,0	16,5	6,0	4,0	10,5	17,5	6,5	4,0	11,0
17,0	6,0	3,9	11,0	16,6	6,1	4,0	10,5	18,0	6,5	4,0	11,5
17,5	6,2	3,9	11,3	17,0	6,0	4,0	11,0	18,0	6,6	4,0	11,4
17,5	6,5	4,0	11,0	17,0	6,1	4,0	10,9	18,5	6,5	4,0	12,0
17,7	6,5	4,0	11,2	17,2	6,2	4,0	11,0	18,0	7,0	4,2	11,0
16,8	6,1	3,8	10,7	16,4	5,9	3,9	10,5	17,2	6,4	3,9	10,8

Tabelle I (Fortsetzung).

Gesamtlänge	Rumpflänge	Rumpfbreite	Schwanzlänge	Gesamtlänge	Rumpflänge	Rumpfbreite	Schwanzlänge	Gesamtlänge	Rumpflänge	Rumpfbreite	Schwanzlänge
Gruppe k: Jodothyrin 1:100000				Gruppe l: Jodothyrin 1:1000000				Gruppe m: Jodothyrin 1:10000000			
16,1	5,8	3,6	10,3	15,3	5,0	3,6	10,3	16,0	6,0	3,9	10,0
16,5	6,0	3,9	10,5	15,7	6,0	3,9	9,7	16,5	6,0	4,0	10,5
17,0	6,5	4,0	10,5	16,0	6,2	3,9	9,8	16,5	6,0	3,8	10,5
17,1	6,1	4,0	11,0	16,6	6,2	3,9	10,7	16,5	6,3	4,0	10,2
17,2	6,2	4,0	11,0	17,0	6,0	4,0	11,0	17,0	6,1	4,0	10,9
17,5	6,0	4,0	11,5	17,0	6,1	4,0	10,9	17,0	6,3	4,0	10,7
17,5	6,5	4,0	11,0	17,0	6,3	4,0	10,7	17,0	6,5	4,0	10,5
18,0	6,8	4,2	11,2	17,2	6,3	3,8	10,9	17,6	6,6	4,0	11,0
18,3	6,7	4,1	11,6	17,2	6,5	4,1	10,7	18,0	6,6	4,1	11,4
18,5	6,5	4,0	12,0	17,6	6,5	4,2	11,1	18,0	6,6	4,0	11,4
18,6	6,8	4,1	11,8	18,0	6,5	4,1	11,5	18,0	7,1	4,6	10,9
19,0	6,8	4,0	12,2	18,0	6,6	4,5	11,4	18,5	7,0	4,4	11,5
17,6	6,4	4,0	11,2	16,9	6,2	4,0	10,7	17,2	6,4	4,1	10,8
Gruppe n: Jodothyrin 1:100000000				Gruppe o: Jodthyreoglobulin 1:100000				Gruppe p: Jodthyreoglobulin 1:1000000			
17,0	6,0	3,8	11,0	16,0	6,0	4,0	10,0	17,1	6,5	4,0	10,6
17,0	6,0	3,9	11,0	16,2	6,5	4,0	9,7	17,6	6,5	4,0	11,1
17,0	6,1	4,0	10,9	16,5	6,1	4,0	10,4	17,5	6,5	4,1	11,0
17,5	6,0	4,0	11,5	16,5	6,1	4,0	10,4	17,6	6,6	4,0	11,0
17,5	6,5	4,0	11,0	17,0	6,5	4,0	10,5	17,6	6,6	4,1	11,0
17,5	6,6	4,0	10,9	17,2	6,2	3,7	11,0	17,8	7,0	4,0	10,8
17,6	6,6	4,1	11,0	17,5	6,0	3,9	11,5	18,0	7,0	4,5	11,0
17,7	6,6	4,0	11,1	17,5	6,2	4,0	11,3	18,2	6,9	4,1	11,3
18,0	6,6	4,1	11,4	17,5	6,5	4,0	11,0	18,2	7,0	4,1	11,2
18,0	6,6	4,4	11,4	17,5	6,5	4,0	11,0	18,5	6,8	4,4	11,7
18,5	6,6	4,0	11,9	17,5	6,6	4,1	10,9	18,7	7,0	4,1	11,7
19,0	7,0	4,2	12,0	18,0	6,9	4,1	11,1				
17,8	6,6	4,0	11,2	17,1	6,3	4,0	10,8	17,8	6,7	4,1	11,1
Gruppe qu: Jodthyreoglobulin 1:10000000				Gruppe r: Jodthyreoglobulin 1:100000000							
16,0	6,0	3,8	10,0	16,5	6,0	3,6	10,5				
16,0	6,0	4,0	10,0	17,0	6,0	3,9	11,0				
16,5	6,2	4,0	10,3	17,0	6,0	4,0	11,0				
17,0	6,2	4,1	10,8	17,0	6,1	4,0	10,9				
17,0	6,5	4,0	10,5	17,2	6,4	4,0	10,8				
17,0	6,5	4,0	10,5	17,2	6,5	4,0	10,7				
17,5	6,5	4,0	11,0	17,2	6,5	4,0	10,7				
17,5	6,6	4,4	10,9	17,5	6,5	4,1	11,0				
18,0	6,7	4,0	11,3	17,5	7,0	4,0	10,5				
18,0	7,0	4,0	11,0	17,5	6,6	4,1	10,9				
19,0	7,0	4,1	12,0	18,0	6,9	4,4	11,1				
				18,2	6,8	4,1	11,4				
17,2	6,5	4,0	10,7	17,3	6,4	4,0	10,9				

Gruppe, bei fünf derselben liegt der linke vordere Extremitätenstummel frei. Fixierung: Gruppe b: Nr. 3455, 3456.

5. April. Von sämtlichen Gruppen (mit Ausnahme von Gruppe b, in der nur noch sechs Tiere leben) werden je zwölf Larven bei natürlicher Größe photographiert und später nach den Abzügen ausgemessen. Die erhaltenen Werte sind in Tabelle I zusammengestellt.

Weitaus am kleinsten von allen Kaulquappen sind demnach jene der Gruppe b, in der sich ja auch am frühesten die charakteristischen Schilddrüsensymptome bemerkbar machten. Wie die bei vierfacher Vergrößerung aufgenommene Abb. 2a und b zeigt, ist der Rumpf der Tiere geigenförmig, die Kontur des Kopfes abgestumpft, der Schwanz kurz und fleischig, da die Flossensäume völlig resorbiert sind, während das Achsenskelett mit der umgebenden Muskulatur zur Hälfte oder einem Drittel noch vorhanden ist. Die hinteren Extremitätenanlagen sind stummelartig, leicht zugespitzt, aber noch kaum pigmentiert. Von den vorderen Extremitäten ist bei allen Tieren der Gruppe die linke infolge frühzeitiger Resorption des Operculums bereits sichtbar geworden, die rechte schimmert durch die Hautdecke durch. Oberhalb der linken Extremität sind die bereits stark verkleinerten inneren Kiemen sichtbar. Recht deutlich treten an Abb. 2 auch die Unterschiede in der Ausbildung des Maules hervor.

Schwächer, aber noch deutlich erkennbar, ist die Wirkung bei Gruppe c, bei der zwar noch keine Einschmelzung des Schwanzes, aber eine beträchtliche Wachstumshemmung zu beobachten ist. Die seitliche Konturlinie des Rumpfes verläuft nicht rundlich geschwungen, wie bei den Kontrolllarven (siehe Abb. 1a), sondern spitzt sich kaudalwärts stark zu. Hinter dem durch Kiemenskelett und Ohrkapsel bedingten Vorsprung ist sie schwach eingekerbt. Die Entwicklung der Extremitäten ist schwach beschleunigt. In Gruppe d ist, wie die Messungen erkennen lassen, noch eine geringe Wachstumshemmung nachweisbar; die äußere Form der Kaulquappen, die noch vollkommen im Besitz ihrer larvalen Merkmale sind, gibt nur noch eine sehr schwache Beeinflussung kund. Die Tiere der mit der schwächsten der Thyroxinlösungen behandelten Gruppe f übertreffen dagegen die der Kontrollgruppe sogar etwas an Größe, so daß hier, zunächst wenigstens, eher eine Umkehr der gemeiniglich bekannten Schilddrüsenwirkung eingetreten ist.

Bei den mit Dijodtyrosin behandelten Tieren ist der charakteristische Einfluß zurzeit noch beträchtlich schwächer. Gruppe f zeigt zwar deutlich Wachstumshemmung, in ihrer äußeren Erscheinung stehen die Tiere aber zwischen jenen der Gruppe c und d. Bei den mit schwächeren Dosen behandelten Tieren der Gruppe g und h ist dagegen von einer spezifischen Wirkung noch nichts zu erkennen; bei Gruppe i liegen die Werte ähnlich wie bei Gruppe e, sogar wieder etwas höher als bei der Kontrolle.

Bei den mit Jodothyrin und den mit Jodthyreoglobulin behandelten Gruppen vollends ist beinahe durchgehends eine wenn auch nur geringe Steigerung des Wachstums zu erkennen. Äußerlich gleichen die Tiere dieser Gruppen völlig den normalen Vergleichstieren.

Zur späteren histologischen Untersuchung werden die sechs noch lebenden Tiere der Gruppe b fixiert (Nr. 3457: 19 mg; Nr. 3458: 17 mg: Nr. 3459: 17 mg; Nr. 3460: 17 mg; Nr. 3461: 22 mg; Nr. 3462: 19 mg). Zum Vergleich dazu dienen einige Larven aus einer Parallelgruppe von Gruppe a, die dem gleichen Laich entstammt und mit aufgezüchtet wurde, um zu verhindern, daß die Zahl der Tiere in der eigentlichen Kontrollgruppe

durch die Vornahme von Fixierungen zu sehr vermindert wird (Nr. 3463: 65 mg; Nr. 3464: 63 mg; Nr. 3465: 69 mg; Nr. 3466: 44 mg).

Das Ergebnis des bisherigen Versuchsverlaufes ist also, daß die Wirkung des Thyroxins auf junge Froschlarven mit jener, die durch Fütterung mit Schilddrüse hervorgerufen wird, äußerlich völlig übereinstimmt. Die zweimalige Einwirkung einer Lösung von 1 : 1000000 wirkt so wie die mehrmalige Fütterung mit frischer Schilddrüse. Eine Thyroxinlösung von 1 : 10000000 kommt in ihrer Wirksamkeit auf junge Froschlarven einer Dijodtyrosinlösung von 1 : 100000 gleich, die hinwiederum einer gleich starken Lösung von Jodothyrin und von Jodthyreoglobulin überlegen ist. Stark unterschwellige Dosen scheinen einen dem typischen Schilddrüseneffekt entgegengesetzten Einfluß auszuüben, insofern bei ihnen eher eine wachstumsanregende Wirkung zu beobachten ist. Das würde mit einer Beobachtung übereinstimmen, die ich bereits früher bei nicht sehr starker Fütterung junger Larven mit frischer Schilddrüse erheben konnte: daß nämlich hierbei während der ersten Zeit, bevor der typische Einfluß zum Durchbruch kommt, die Tiere stärker wachsen als die normalen Vergleichslarven.

Diese Ergebnisse werden durch den weiteren Verlauf des Versuches noch wesentlich erweitert.

Im Laufe der nächsten Tage tritt die Schilddrüsenwirkung in Gruppe c immer stärker hervor, wobei sich die gleichen Erscheinungen wie in Gruppe b wiederholen, nur in verlangsamtem Zeitmaß. Am 10. April ist bei vier Tieren die linksseitige Opercularmembran resorbiert, am 11. April bei zweien davon auch die der rechten Seite. In der Nacht vom 12. auf den 13. sind drei Tiere tot.

Am 13. April werden wieder einige Tiere zur späteren histologischen Untersuchung fixiert. Aus Gruppe a: Nr. 3484: 94 mg; Gruppe d: Nr. 3485: 54 mg; Gruppe f: Nr. 3486: 32 mg; Gruppe g: Nr. 3487: 38 mg; Gruppe k: Nr. 3488: 67 mg; Gruppe o: Nr. 3489: 101 mg.

15. und 16. April. In Gruppe c sterben noch weitere elf Tiere; bei neun davon sind die linken Vorderbeine „durchgebrochen“. — Am 18. April ist von Gruppe c nur noch ein Tier am Leben (siehe Abb. 3b). Zum Vergleich damit werden auch die Tiere der übrigen Gruppen wieder photographiert und in der oben beschriebenen Weise gemessen (siehe Tabelle II).

Beträchtlich schwächer als in Gruppe c ist der Einfluß des Thyroxins in Gruppe d (siehe Abb. 3c); obwohl auch hier das Wachstum noch deutlich gehemmt ist. Auffallend ist die Zunahme der Variationsbreite der Gesamtlänge, die in Gruppe a 5,2 mm, in Gruppe d dagegen 9,4 mm beträgt. Die Extremitätenanlagen sind bei den Larven der in Rede stehenden Gruppe durchgehends in Oberschenkel, Unterschenkel und Fuß mit Zehenanlagen gegliedert, während die Kontrolltiere erst kurze, völlig ungegliederte Stummel besitzen. Die Lippen sind in Gruppe d etwas verschmälert und mit kleineren und spärlicheren Papillen versehen; doch sind die Hornhäkchen wie Hornkiefer noch gut erhalten.

Selbst in Gruppe e ist noch etwas Schilddrüsenwirkung bemerkbar, insofern auch hier, abgesehen von der aus der Tabelle ersichtlichen Wachstumshemmung, die Entwicklung der Extremitäten beschleunigt ist. Dieselbe

macht sich sowohl in der weiter fortgeschrittenen Gliederung, Pigmentierung wie auch in der Größe bemerkbar. Die Variationsbreite ist geringer als in Gruppe d (6,1 mm). Die Freßwerkzeuge zeigen noch völlig larvalen Typus.

Die Folgen der Dijodtyrosinbehandlung haben sich nunmehr gegenüber dem am 5. April festgestellten Befund erheblich verstärkt. Besonders in Gruppe f (siehe Abb. 3d) ist das Wachstum stark zurückgeblieben. Die Tiere dieser Gruppe entsprechen jetzt an Größe und Entwicklungsstand etwa der Gruppe c der Thyroxintiere. Der Kopf der Tiere ist froschähnlich gestaltet, die Hornkiefer abgeworfen, Lippen, Papillen usw. völlig zurückgebildet. Bei drei Tieren ist je ein linkes Vorderbein „durchgebrochen", aber auch bei den übrigen ist die Entwicklung der Extremitäten wesentlich beschleunigt. Schwächer ist die Beeinflussung in Gruppe g (Abb. 3e). Die Hornkiefer sind hier nur defekt; die Vorderbeine liegen bei sämtlichen Kaulquappen noch verdeckt, doch ist ihre Entwicklung deutlich beschleunigt.

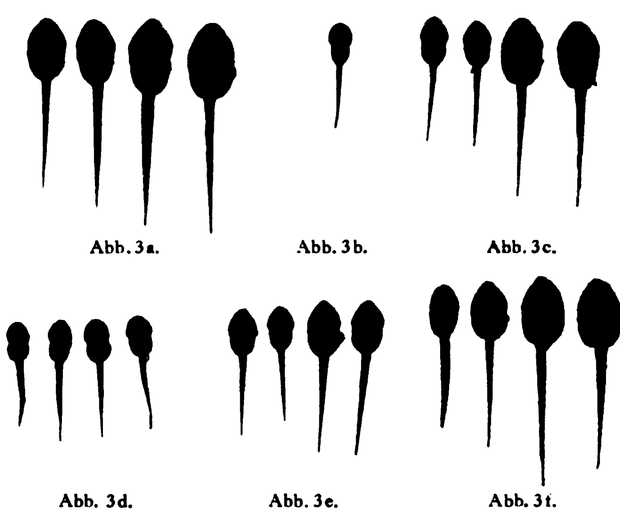


Abb. 3. Versuch 573. 34tägige Kaulquappen. Aufgenommen am 18. 4. 1922. Natürliche Größe. 3a: Gruppe a, Kontrolle. — 3b: Gruppe c, Thyroxin 1:10000000 (2×). — 3c: Gruppe d, Thyroxin 1:100000000 (2×). — 3d: Gruppe f, Dijodtyrosin 1:100000 (2×). — 3e: Gruppe g, Dijodtyrosin 1:10000000 (2×). — 3f: Gruppe k, Jodothyrin 1:100000 (2×).

In Gruppe h fällt wieder die erhöhte Variationsbreite der Körpergröße auf. Die Hornkiefer sind hier etwas schadhaft; die Lippen sind aber breiter und in ihren Hilfswerkzeugen besser ausgebildet als in Gruppe g. Die Kopfform ist nicht mehr ganz larval, aber auch noch nicht wie bei typischen Schilddrüsentieren. Die Extremitäten sind bei allen Larven in ihrer Entwicklung gleichmäßig beschleunigt, bei den kleinsten der Tiere ebenso wie bei den größten. In Gruppe i ist nur mehr eine geringe Hemmung des Wachstums erkennbar, während das Äußere der Tiere rein larvalen Typus zeigt.

Nur sehr geringfügig ist die Beeinflussung bei den mit Jodothyrin behandelten Gruppen k bis n (als Beispiel siehe Abb. 3f = Gruppe k). Abgesehen davon, daß die Durchschnittsgröße etwas niedriger ist als in Gruppe a, läßt sich nur in Gruppe k noch eine leichte Entwicklungsförderung der Extremitäten feststellen. Von den Jodthyreoglobulingruppen o bis r

Tabelle II.

Gesamtlänge	Rumpflänge	Rumpfbreite	Schwanzlänge	Gesamtlänge	Rumpflänge	Rumpfbreite	Schwanzlänge	Gesamtlänge	Rumpflänge	Rumpfbreite	Schwanzlänge
Gruppe a: Kontrolle				Gruppe c: Thyroxin 1:10000000				Gruppe d: Thyroxin 1:100000000			
23,0	8,5	5,5	14,5	14,0	5,5	3,5	8,5	16,1	6,1	4,0	10,0
24,5	9,0	5,4	15,5					16,7	6,5	4,0	10,2
25,0	9,0	5,3	16,0					17,6	6,6	4,4	11,0
25,6	9,0	5,6	16,6					18,7	7,0	4,5	11,7
25,7	9,5	5,6	16,2					20,1	7,3	4,6	12,8
26,2	9,5	6,0	16,7					20,5	7,5	5,0	13,0
27,0	9,5	5,7	17,5					21,5	7,5	4,7	14,0
27,5	10,5	6,0	17,0					23,0	8,5	5,5	14,5
28,1	10,5	6,5	17,6					23,2	8,5	5,5	14,7
28,2	10,0	6,0	18,2					23,6	8,5	5,0	15,1
								24,0	9,1	5,7	14,9
								24,2	9,0	5,6	15,2
								24,5	9,0	6,0	15,5
								25,5	9,2	6,0	16,3
26,1	9,5	5,7	16,6					21,5	7,9	5,1	13,6
Gruppe e: Thyroxin 1:1000000000				Gruppe f: Dijodtyrosin 1:100000				Gruppe g: Dijodtyrosin 1:1000000			
19,0	7,0	4,5	12,0	14,0	5,5	3,3	8,5	14,7	5,4	3,5	9,3
19,5	7,0	4,6	12,5	14,0	5,2	3,3	8,8	15,3	5,9	3,5	9,4
20,5	7,5	4,5	13,0	14,5	5,0	3,1	9,5	16,5	6,0	3,8	10,5
20,5	7,5	5,0	13,0	14,5	5,0	3,5	9,5	16,5	6,0	3,9	10,5
21,5	8,0	4,6	13,5	14,5	5,0	3,2	9,5	17,5	6,5	3,9	11,0
23,5	8,6	5,0	14,9	14,5	5,2	3,2	9,3	17,7	6,7	4,0	11,0
23,4	8,6	5,4	14,8	14,5	5,4	3,5	9,1	17,7	6,5	4,0	11,2
23,5	9,0	5,5	14,5	15,0	5,5	3,2	9,5	18,6	6,7	4,1	11,9
23,7	8,5	5,0	15,2	15,0	5,5	3,5	9,5	20,1	7,5	4,5	12,6
23,7	8,7	5,5	15,0	15,4	5,5	3,5	9,9	20,3	7,0	4,5	13,3
23,7	8,8	5,5	14,9	15,5	5,5	3,3	10,0				
24,0	9,0	5,5	15,0	15,5	5,6	3,5	9,9				
24,5	9,0	5,5	15,5								
25,1	9,5	5,6	15,6								
22,6	8,3	5,1	14,3	14,7	5,3	3,3	9,4	17,5	6,4	3,9	11,1
Gruppe h: Dijodtyrosin 1:10000000				Gruppe i: Dijodtyrosin 1:100000000				Gruppe k: Jodothyrin 1:100000			
15,5	5,8	3,5	9,7	20,0	7,7	5,0	12,3	19,0	7,0	4,5	12,0
16,0	5,6	3,5	10,4	21,5	8,0	5,0	13,5	21,0	8,0	5,2	13,0
16,2	6,2	3,6	10,0	23,0	8,5	5,0	14,5	22,5	8,0	5,0	14,5
16,6	6,6	4,0	10,0	23,2	8,7	5,4	14,5	23,0	8,5	5,2	14,5
16,7	6,5	4,0	10,2	23,5	9,0	5,5	14,5	23,0	9,0	5,5	14,0
17,0	6,5	3,8	10,5	23,6	9,0	5,4	14,6	23,2	8,5	5,6	14,7
17,6	6,5	4,1	11,1	24,0	8,7	5,4	15,3	24,5	9,5	5,7	15,0
21,4	7,8	4,9	13,6	24,0	9,0	5,5	15,0	25,0	9,2	6,0	15,8
22,0	8,0	4,8	14,0	24,0	9,0	5,5	15,0	25,1	9,5	5,8	15,6
22,0	8,1	5,1	13,9	24,0	9,0	5,6	15,0	25,3	9,5	6,0	15,8
22,5	8,1	4,9	14,4	24,0	9,0	5,6	15,0	25,6	9,6	5,5	16,0
23,5	8,5	5,0	15,0	25,0	9,0	5,2	16,0	26,5	9,7	6,0	16,8
23,5	8,6	5,1	14,9	25,0	9,0	5,5	16,0				
				25,5	9,0	5,5	15,5				
19,2	7,1	4,3	12,1	23,6	8,8	5,4	14,8	23,6	8,8	5,5	14,8

Tabelle II (Fortsetzung).

Gesamtlänge	Rumpflänge	Rumpfbreite	Schwanzlänge	Gesamtlänge	Rumpflänge	Rumpfbreite	Schwanzlänge	Gesamtlänge	Rumpflänge	Rumpfbreite	Schwanzlänge
Gruppe l: Jodothyrin 1 : 1000000				Gruppe m: Jodothyrin 1 : 10000000				Gruppe n: Jodothyrin 1 : 100000000			
22,0	8,5	5,0	13,5	21,5	8,0	4,7	13,5	21,3	7,7	5,0	13,6
22,6	8,4	4,9	14,2	22,5	8,5	5,3	14,0	21,7	8,0	5,0	13,7
23,5	8,3	4,8	15,2	23,0	8,3	5,0	14,7	21,8	7,5	4,6	14,3
24,0	8,5	5,0	15,5	24,0	8,5	5,2	15,5	22,5	8,0	4,8	14,5
24,0	8,7	5,2	15,3	24,0	8,5	5,2	15,5	22,5	8,0	5,0	14,5
24,0	9,0	5,5	15,0	24,0	8,5	5,5	15,5	23,0	8,6	5,2	14,4
24,2	8,5	5,0	15,7	24,0	8,8	5,4	15,2	23,2	8,0	5,0	15,2
24,5	9,0	5,5	15,5	24,0	9,0	5,3	15,0	23,2	8,2	5,2	15,0
25,5	9,5	5,6	16,0	24,5	8,7	5,2	15,8	23,5	8,7	5,5	14,8
25,6	9,5	5,5	16,1	25,0	9,0	5,5	16,0	25,0	9,0	5,5	16,0
25,6	9,5	6,0	16,1	27,5	10,0	6,0	17,5	25,2	9,5	5,5	15,7
26,0	9,5	6,0	16,5	27,5	10,2	6,2	17,3	25,6	9,4	5,5	16,2
26,5	10,0	6,0	16,5	28,6	10,5	6,3	18,1	27,5	9,5	6,0	18,0
28,5	10,5	6,6	18,0					27,5	9,6	6,0	17,9
24,7	9,1	5,5	15,6	24,6	9,0	5,4	15,6	23,7	8,5	5,3	15,2

Gesamtlänge	Rumpflänge	Rumpfbreite	Schwanzlänge	Gesamtlänge	Rumpflänge	Rumpfbreite	Schwanzlänge	Gesamtlänge	Rumpflänge	Rumpfbreite	Schwanzlänge
Gruppe o: Jodthyreoglobulin 1 : 100000				Gruppe p: Jodthyreoglobulin 1 : 1000000				Gruppe qu: Jodthyreoglobulin 1 : 10000000			
21,7	8,0	4,8	13,7	23,0	8,0	5,0	15,0	23,0	8,5	5,0	14,5
23,5	8,5	5,0	15,0	24,8	9,0	5,5	15,8	23,2	8,5	5,5	14,7
23,6	8,6	5,1	15,0	25,0	9,0	5,6	16,0	24,0	9,0	6,0	15,0
23,5	8,5	5,0	15,0	25,5	10,0	5,5	15,5	24,5	9,0	5,5	15,5
24,0	8,5	5,0	15,5	26,0	9,5	5,6	16,5	25,0	9,0	5,5	16,0
24,5	8,5	5,0	16,0	26,0	9,6	5,5	16,4	25,0	9,0	5,6	16,0
24,5	9,0	5,5	15,5	26,1	9,7	5,8	16,4	25,0	9,5	6,0	15,5
24,6	9,0	5,0	15,6	26,6	9,6	5,8	17,0	25,5	9,3	5,5	16,2
25,0	9,2	5,0	15,8	27,0	10,0	6,5	17,0	25,6	9,5	5,5	16,1
25,0	9,0	5,0	16,0	28,0	10,0	6,2	18,0	26,5	9,5	5,5	17,0
26,0	9,5	5,0	16,5	28,0	10,1	6,0	17,9	28,0	10,4	6,1	17,6
								28,5	10,0	6,0	18,5
24,2	8,8	5,0	15,4	26,0	9,5	5,7	16,5	25,3	9,3	5,6	16,0

Gruppe r: Jodthyreoglobulin 1 : 100000000			
24,2	8,7	5,0	15,5
26,0	9,5	5,5	16,5
26,1	9,0	5,6	17,1
26,5	9,5	5,5	17,0
27,5	10,0	6,0	17,5
27,6	10,6	6,5	17,0
27,8	9,8	5,8	18,0
28,0	10,0	6,0	18,0
28,0	10,5	6,5	17,5
28,0	10,8	6,5	17,2
28,5	10,2	5,8	18,3
27,1	9,9	5,9	17,2

weist lediglich die erste etwas niedrigere Größenmaße auf. Die Entwicklung der Hinterbeine ist bei Gruppe o und p gegenüber der Kontrollgruppe nur ganz leicht beschleunigt (Anlagen etwas größer, auf der Streckseite pigmentiert; eine leichte Krümmung der Anlage läßt den Beginn einer Differenzierung erkennen). Die larvalen Organe sind jedoch noch völlig intakt.

7. Mai. Die noch lebenden Tiere der Gruppe f sind recht schwächlich, so daß sie, um sie für die histologische Untersuchung nicht zu verlieren, fixiert werden (Nr. 3554: 25 mg; Nr. 3566: 27 mg; Nr. 3567: 27 mg; Nr. 3568: 25 mg). Die Tiere sind, wie auch die Gewichtszahlen erkennen lassen, durchgehends sehr klein. Ihre larvalen Freßwerkzeuge sind weitgehend zurückgebildet, der Spiraldarm ist verkürzt, die Flossensäume besonders ventral in der Gegend des Kloakenrohres stark verschmälert,

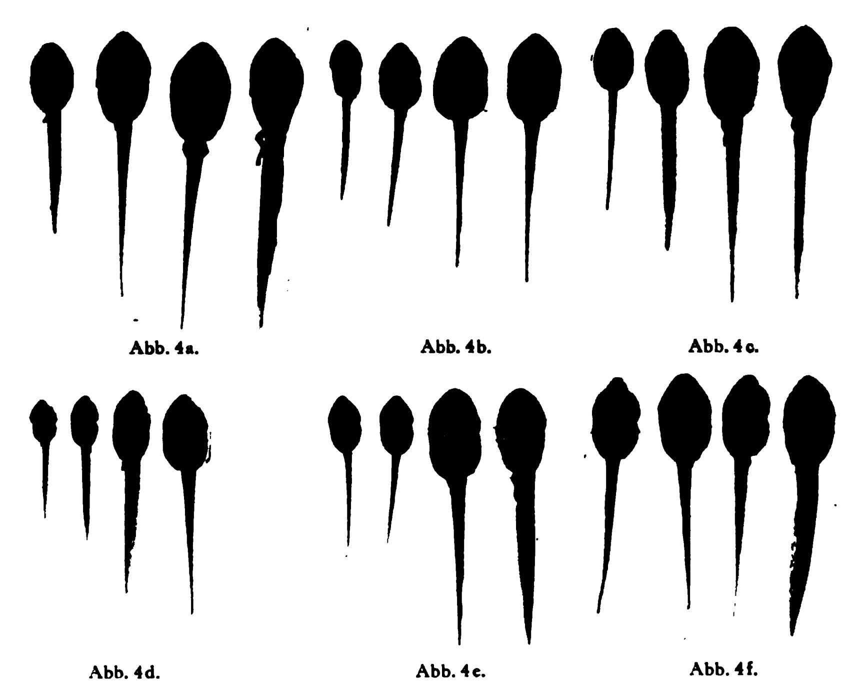


Abb. 4. Versuch 573. 60tägige Kaulquappen. Aufgenommen am 13. 5. 1922. Natürliche Größe. 4a: Gruppe a, Kontrolle. — 4b: Gruppe d, Thyroxin 1:100000000 (2×). — 4c: Gruppe c, Thyroxin 1:1000000000 (2×). — 4d: Gruppe g, Dijodtyrosin 1:1000000 (2×). — 4e: Gruppe h, Dijodtyrosin 1:10000000 (2×). — 4f: Gruppe i, Dijodtyrosin 1:100000000 (2×).

während an den Schwanzspitzen noch keine starke Gewebseinschmelzung vor sich gegangen ist. Die Opercularmembran ist bei Nr. 3566 und 3567 auf der linken Seite durchlocht, so daß der Stummel des linken Vorderbeines freiliegt. Die auf der Streckseite dunkel pigmentierten Extremitätenanlagen sind in Oberschenkel, Unterschenkel und Fußplatte gegliedert. Die Tiere zeigen also eine „Thyreoideawirkung“ mittleren Grades.

13. Mai. Die Gruppen a bis k, soweit sie noch vorhanden sind, photographiert und gemessen (siehe Tabelle III).

Bei den Thyroxingruppen d und e, insbesondere aber in Gruppe d, ist das Körperwachstum noch immer hinter dem der Kontrollgruppe zu-

Tabelle III.

Gesamtlänge	Rumpflänge	Rumpfbreite	Schwanzlänge	Gesamtlänge	Rumpflänge	Rumpfbreite	Schwanzlänge	Gesamtlänge	Rumpflänge	Rumpfbreite	Schwanzlänge
Gruppe a: Kontrolle				Gruppe d: Thyroxin 1 : 100 000 000				Gruppe e: Thyroxin 1 : 1 000 000 000			
25,0	9,0	5,5	16,0	21,0	7,7	4,6	14,3	24,5	8,2	5,2	16,3
34,5	12,3	7,5	22,2	24,1	9,0	6,0	15,1	29,0	10,2	6,6	18,8
35,0	12,2	7,0	22,8	26,6	9,6	6,0	17,0	29,6	10,5	6,9	19,1
35,2	12,5	7,9	22,7	27,5	9,8	6,0	17,7	31,4	11,5	7,6	19,9
35,5	12,0	7,0	23,5	27,5	10,0	7,0	17,5	33,0	11,5	6,9	21,5
37,5	13,0	7,5	24,5	29,5	10,0	6,8	19,5	33,1	11,2	7,0	21,9
37,5	13,4	8,0	24,1	29,5	10,5	6,6	19,0	34,0	11,6	6,9	22,4
37,6	13,0	8,0	24,6	30,3	11,0	7,5	19,3	34,0	12,0	7,2	22,0
38,0	13,2	8,0	24,8	31,5	11,2	7,2	20,3	35,0	12,2	7,1	22,8
				32,6	11,6	7,2	21,0	37,0	12,5	7,5	24,5
35,1	12,3	7,4	22,8	28,1	10,0	6,5	18,1	32,0	11,1	6,9	20,9
Gruppe g: Dijodtyrosin 1 : 1 000 000				Gruppe h: Dijodtyrosin 1 : 10 000 000				Gruppe i: Dijodtyrosin 1 : 100 000 000			
13,5	4,5	3,4	9,0	20,7	7,5	4,5	13,2	31,0	11,5	6,8	19,5
17,0	5,5	3,5	11,5	21,0	8,0	4,8	13,0	32,0	11,0	6,6	21,0
19,0	6,6	4,0	12,4	23,5	8,5	5,2	15,0	32,0	11,0	6,5	21,0
22,0	8,0	5,0	14,0	24,0	8,6	5,2	15,4	32,0	11,5	7,0	20,5
23,0	8,0	5,0	15,0	24,3	8,7	5,5	15,6	32,0	11,5	7,0	20,5
23,1	8,5	5,1	14,6	27,2	10,2	6,0	17,0	32,1	12,0	7,5	20,1
25,4	9,0	5,1	16,4	29,2	10,0	6,1	19,2	32,2	11,6	7,1	20,6
27,5	9,5	5,2	18,0	29,5	10,5	6,2	19,0	33,5	12,0	7,0	21,5
28,6	10,0	6,4	18,6	32,0	11,3	6,6	20,7	34,0	12,0	7,5	22,0
				33,6	11,0	6,8	22,6	34,5	12,1	7,3	22,4
				34,0	12,0	7,2	22,0				
22,1	7,7	4,7	14,4	27,2	9,7	5,8	17,5	32,5	11,6	7,0	20,9

Gruppe k: Jodothyrin 1 : 100 000			
32,5	11,5	7,1	21,0
33,5	11,5	7,0	22,0
33,6	12,3	7,8	21,3
33,7	10,5	6,5	23,2
34,0	11,8	7,5	22,2
35,0	12,0	7,5	23,0
35,0	11,6	6,9	23,4
35,0	12,0	7,2	23,0
35,5	12,5	7,5	23,0
36,5	12,5		24,0
33,4	11,7	7,2	22,7

rückgeblieben. Noch überraschender ist jedoch die nunmehr besonders in der erstgenannten Gruppe zutage tretende Hemmung der Entwicklung [vgl. Abb. 4a (Gruppe a) mit 4b (Gruppe d) und 4c (Gruppe e)]. Während die Larven der Kontrollgruppe durchgehends gut gegliedert bis zu 8 mm lange Hinterbeine besitzen, sind dieselben bei Gruppe d auf der etwa am 18. April

Tabelle IV.

Gesamtlänge	Rumpflänge	Rumpfbreite	Schwanzlänge	Gesamtlänge	Rumpflänge	Rumpfbreite	Schwanzlänge	Gesamtlänge	Rumpflänge	Rumpfbreite	Schwanzlänge
Gruppe a: Kontrolle				Gruppe d: Thyroxin 1 : 100 000 000				Gruppe e: Thyroxin 1 : 1 000 000 000			
25,0	•9,0	5,5	16,0	21,1	8,2	4,6	12,9	25,0	9,0	5,5	16,0
×24,0	12,0	6,2	12,0	26,5	9,6	6,0	16,9	29,6	10,5	6,0	19,1
38,0	12,5	7,6	25,5	28,0	9,7	6,0	18,3	30,6	11,6	7,1	19,0
				29,5	10,5	6,7	19,0	31,5	11,5	7,2	20,0
				30,6	10,5	6,5	20,1	33,2	12,0	7,2	21,2
				31,5	10,7	7,0	20,8	33,5	10,6	7,1	22,9
				32,5	11,6	7,5	20,9	35,0	11,5	7,5	23,5
				32,6	11,7	8,0	20,9				
				36,5	12.5	8,2	24,0				
				29,8	10,5	6,7	19,3	31,2	10,9	6,8	20,3
Gruppe g: Dijodtyrosin 1 : 1 000 000				Gruppe h: Dijodtyrosin 1 : 10 000 000				Gruppe i: Dijodtyrosin 1 : 100 000 000			
15,4	5,2	3,5	10,2	20,5	7,6	5,0	12,9	34,0	11,5	7,0	22,5
15,6	5,8	3,2	9,8	25,5	9,4	6,6	16,1	34,5	11,5	6,6	23,0
21,5	8,5	6,0	13,0	25,7	9,2	6,0	16,5	38,0	11,6	7,0	20,4
27,2	9,5	6,2	17,7	26,0	9,0	5,7	17,0	38,0	12,5	8,0	25,5
27,5	9,6	6,5	17,9	26,0	9,5		16,5	39,0	13,6	8,2	25,4
29,0	10,0	6,1	19,0	26,5	9,6	5,8	16,9	×22,5	11,0	5,8	11,5
29,1	12,0	7,7	17,1	29,8	10,2	6,2	19,6	×25,0	11,0	5,9	14,0
31,0	10,6	6,5	20,4	30,6	10,6	6,7	20,0	×33,0	11,5	6,0	22,5
31,5	11,0	8,2	20,5	33,5	11,5	7,0	22,0	×35,0	12,0	6,2	23,0
				34,0	11,5	7,1	22,5				
25,3	9,1	6,0	16,2	27,8	9,8	6,2	18,0	36,7	12,1	7,3	24,6
				Gruppe p: Jodthyreoglobulin 1 : 1 000 000							
				31,2	11,8	7,0	19,4				
				35,0	12,2	7,7	22,8				
				35,0	13,0	9,0	22,0				
				35,5	12,5	7,4	23,0				
				36,1	12,7	8,0	23,4				
				36,3	12,6	8,6	23,7				
				37,5	13,5	8,6	24,0				
				38,0	13,0	8,1	25,0				
				38,7	14,5	9,1	24,2				
				39,5	14,5	9,0	25,0				
				36,3	13,0	8,3	23,3				

erreichten Entwicklungsstufe stehen geblieben. Auch in ihrer Form und Pigmentierung zeigen die Kaulquappen dieser Gruppen noch völlig larvales Aussehen — mehr als die Kontrolltiere. In Gruppe e ist die Entwicklungshemmung schwächer ausgeprägt.

Sehr stark kommt sie dagegen wieder in den Dijodtyrosingruppen g und h zum Ausdruck, von denen die erstgenannte (siehe Abb. 4d) auch eine sehr beträchtliche Wachstumshemmung aufweist. Während die Tiere

Tabelle V.

Gruppe a: Kontrolle		Gruppe d: Thyroxin 1 : 100 000 000		Gruppe e: Thyroxin 1 : 1 000 000 000		Gruppe g: Dijodtyrosin 1 : 1 000 000	
Nr.	mg	Nr.	mg	Nr.	mg	Nr.	mg
3682	121	3630	73	3639	138	3647	23
3683	359	3631	163	3640	328	3648	26
3684	215	3632	178	3641	272	3649	136
		3633	233	3642	310	3650	186
		3634	246	3643	222	3651	183
		3635	259	3644	244	3652	223
		3636	386	3645	160	3653	229
		3637	313	3646	146	3654	353
		3638	403			3655	393

Gruppe h: Dijodtyrosin 1 : 10 000 000		Gruppe i: Dijodtyrosin 1 : 100 000 000		Gruppe p: Jodthyreoglobulin 1 : 1 000 000	
Nr.	mg	Nr.	mg	Nr.	mg
3663	104	3673	446	3691	241
3664	139	3674	258	3692	418
3665	139	3675	366	3693	358
3666	166	3676	242	3694	366
3667	222	3677	200	3695	422
3668	162	3678	175	3696	482
3669	195	3679	211	3697	473
3670	240	3680	185	3698	571
3671	270	3681	184	3699	574
3672	272			3700	430

der Gruppe e noch manche Merkmale zeigen, die, wie die abweichende Formung des Kopfes, Hornkieferdefekte und andere, normalen Froschlarven nicht zukommen und an die frühere „Schilddrüsenwirkung" erinnern, gleichen die Kaulquappen der Gruppe h, abgesehen von ihrer geringen Größe, völlig normal entwickelten, typischen neotenischen Froschlarven (Abb. 4e). Schwächer ist Wachstums- und Entwicklungshemmung in Gruppe i (Abb. 4f). Unter den übrigen Gruppen des Versuchs ist nur bei Gruppe k noch eine leichte Beeinflussung des Wachstums, in Gruppe p eine Hemmung der Entwicklung zu bemerken.

Am 22. Mai metamorphosieren die ersten Tiere, und zwar in den Gruppen a, o und r. Der Ablauf der Metamorphose in den einzelnen Gruppen wurde wie in früheren Arbeiten wieder in Kurvenform zusammengestellt (siehe Kurve 1, deren Verlauf weiter unten noch näher erörtert wird). Am 25. Mai werden aus Gruppe a eine, aus Gruppe e zwei Larven fixiert. (Nr. 3627: 240 mg; Nr. 3628: 167 mg; Nr. 3629: 175 mg.)

Am 25. Mai. Die Tiere der Gruppen a, d, e, g, h, i und p werden nochmals photographiert und gemessen (siehe Tabelle IV). Sodann werden die einzelnen Tiere mit Hilfe der Torsionswage gewogen und zur weiteren histologischen Untersuchung fixiert. Die bei der Wägung erhaltenen Werte sind in Tabelle V zusammengestellt.

In der Kontrollgruppe sind am 27. Mai nur noch drei Tiere am Leben (siehe Abb. 5a); alle übrigen sind schon einige Tage vorher zum Landleben

übergegangen und abgetötet. Bei dem einen der drei Tiere (Nr. 3682) sind die Vorderbeine schon seit dem vorangehenden Tage durchgebrochen, bei dem zweiten (Nr. 3683) wäre der Durchbruch mit Sicherheit in den nächsten Tagen erfolgt. Nur das dritte noch lebende Kontrolltier (Nr. 3684) ist sowohl im Wachstum wie in seiner Entwicklung stark zurückgeblieben.

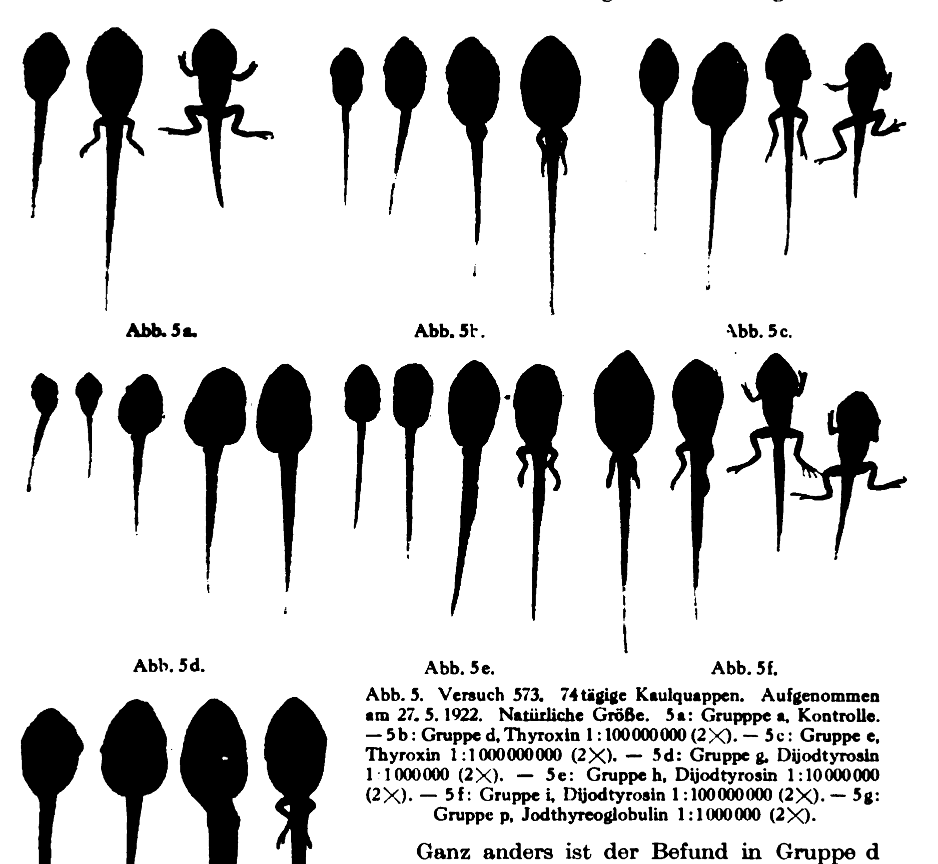


Abb. 5g.

Abb. 5. Versuch 573. 74tägige Kaulquappen. Aufgenommen am 27. 5. 1922. Natürliche Größe. 5a: Grupppe a, Kontrolle. — 5b: Gruppe d, Thyroxin 1:100000000 (2×). — 5c: Gruppe e, Thyroxin 1:1000000000 (2×). — 5d: Gruppe g, Dijodtyrosin 1:1000000 (2×). — 5e: Gruppe h, Dijodtyrosin 1:10000000 (2×). — 5f: Gruppe i, Dijodtyrosin 1:100000000 (2×). — 5g: Gruppe p, Jodthyreoglobulin 1:1000000 (2×).

Ganz anders ist der Befund in Gruppe d (siehe Abb. 5b), in der bis jetzt noch keine einzige Kaulquappe zur Verwandlung gekommen ist. Das Körperwachstum hat zwar, wie ein Vergleich der Maßzahlen mit jenen vom 18. April lehrt, in dieser Zeitperiode Fortschritte gemacht, die Entwicklung der Extremitäten ist jedoch seit langer Zeit äußerlich stehen geblieben, so daß die Tiere, mit Ausnahme der beiden größten Larven Nr. 3637 und 3638 nur ganz kurze Hinterbeine besitzen. Die Variationsbreite zwischen größtem und kleinstem Tier hat sich beträchtlich vergrößert; sie beträgt jetzt 15,4 mm bzw. 330 mg.

Geringer ist die Hemmung bei Gruppe e, in welcher zwei Tiere am 25. Mai die Metamorphose als äußerlich normal gestaltete Fröschchen beendeten. Ein drittes (siehe Abb. 5c, Nr. 3646) metamorphosierte am

26. Mai. Bei einem weiteren (Nr. 3645) ist das rechte Vorderbein durchgebrochen. Bei Nr. 3644 und 3643 wäre die Metamorphose wohl in wenigen Tagen vor sich gegangen. Die übrigen Tiere (Nr. 3639 bis 3642) sind dagegen in ihrer Entwicklung wieder stärker gehemmt. Der Größenunterschied zwischen größtem und kleinstem Tier ist hier geringer als in Gruppe d (10,0 mm bzw. 172 mg).

Um so stärker ist er in der Dijodtyrosingruppe g (16,1 mm bzw. 370 mg), in der die Entwicklung der Extremitäten noch stärker gehemmt ist wie in Gruppe d (siehe Abb. 5d). Die Durchschnittsgröße ist ebenfalls niedriger. Die auffallende Breite des Rumpfes, die bei einigen der Larven die Breite des Kopfes beträchtlich übertrifft, ist nicht etwa durch Bauchwassersucht, sondern durch eine extrem starke Ausbildung der Darmspirale bedingt.

Auch in Gruppe h ist die Entwicklungshemmung beträchtlich (Abb. 5e). Die Durchschnittsgröße der Tiere ist weit hinter den normalen Werten zurückgeblieben. Die Variationsbreite beträgt 13,5 mm bzw. 168 mg. Die Entwicklung der Extremitäten ist ebenfalls stark gehemmt; die Hinterbeine sind noch ganz klein; nur bei einem einzigen Tier Nr. 3672 sind sie in der letzten Zeit stärker gewachsen, so daß bei diesem wohl in etwa 8 Tagen der Durchtritt der Vorderbeine zu erwarten wäre. Auch hier ist bei einigen Larven der Rumpf stark aufgetrieben, aber bei ihnen weniger infolge einer übermäßigen Größe der Darmspirale als durch Flüssigkeitsansammlung.

Ganz anders ist der Stand der Entwicklung in der schwächsten Dijodtyrosingruppe i (siehe Abb. 5f), in welcher sich im ganzen schon fünf Tiere zu normal ausgebildeten Fröschchen umgewandelt haben und auch die übrigen fünf kurz vor Beginn der Metamorphose stehen. Die entwicklungshemmende Wirkung des Dijodtyrosins, die in den Gruppen g und h so stark hervortritt, macht sich demnach in dieser Gruppe kaum bemerkbar, wie in ihr ja auch der wachstumshemmende Einfluß von Anfang an nur sehr gering war.

Bei den übrigen Gruppen haben sich am 27. Mai schon eine Reihe von Tieren zu gut ausgebildeten Fröschchen verwandelt. Wie die Übersicht über den Durchtritt beider Vorderbeine in Abb. 6 ergibt, setzt die Metamorphose in diesen Gruppen meist einige Tage später ein als bei der Kontrollgruppe. Außerdem zieht es sich bei ihnen länger hin, bis sich alle Tiere verwandelt haben, ohne daß es jedoch zu einer so ausgesprochenen Hemmung wie in Gruppe d, e, g und h käme.

Nur *eine* Gruppe macht noch eine Ausnahme: die Gruppe p, die unter dem Einfluß einer Jodthyreoglobulinlösung 1:1000000 stand und deren Tiere einerseits durch ihre Größe, andererseits durch das Zurückbleiben ihrer Entwicklung auffallen (siehe Abb. 5g). Nur bei *einem* Tier der Gruppe sind die Extremitäten so groß, daß nach etwa 5 Tagen die Metamorphose zu erwarten wäre. Ob diese Hemmung der Entwicklung in ursächlichem Zusammenhang mit der Einwirkung des Jodthyreoglobulins steht, vermag ich nicht zu entscheiden; die Möglichkeit muß zugegeben werden, da auch in der nachfolgenden Gruppe der Eintritt der Metamorphose verzögert ist, wenn auch lange nicht so stark.

Ergebnisse des Versuchs 578.

1. Durch die zweimalige Einwirkung einer Thyroxinlösung in der Verdünnung von 1: 1000000 auf junge, zwölftägige Froschlarven von Rana temporaria werden in wenigen Tagen die charakteristischen Merkmale einer Schilddrüsenfütterung hervorgerufen.

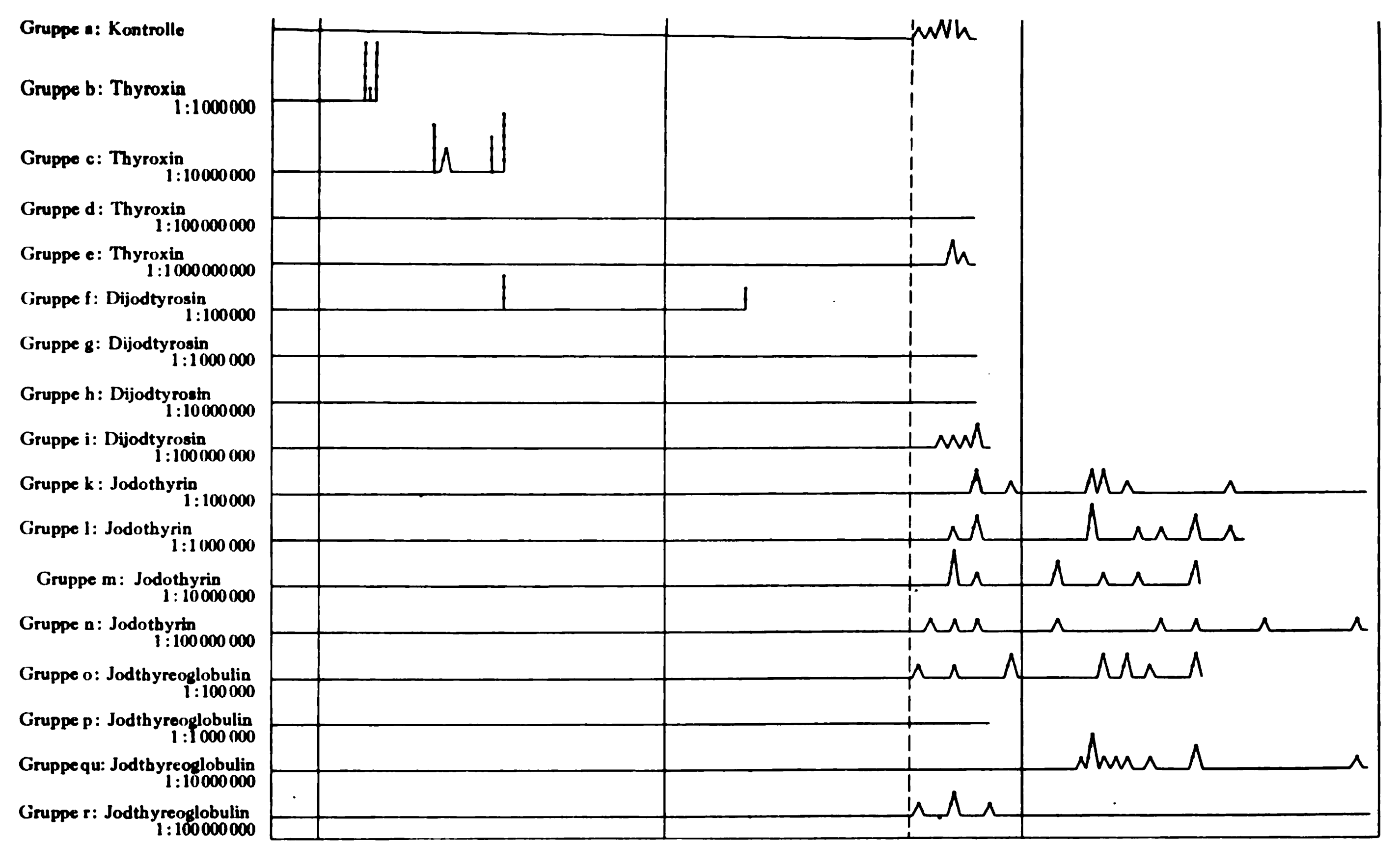


Abb. 6. Der Durchbruch *beider* Vorderbeine ist in der Kurve durch eine Zacke dargestellt. Bricht dagegen, wie es z. B. in Gruppe b der Fall ist, nur *eines* der beiden Vorderbeine durch, so ist statt dessen eine Senkrechte eingezeichnet. Aus der auf der Zacke bezw. Senkrechten eingetragenen Anzahl von Punkten ist die Zahl der an dem betreffenden Tage metamorphosierten Tiere abzulesen. Die Tiere der Gruppen a, d, e, g, h, i und p werden am 27. V. 1922 fixiert.

2. Das gleiche ist bei einer Lösung von 1: 10000000 der Fall. Der Schilddrüseneffekt tritt hier unter sonst gleichen Bedingungen, jedoch langsamer und weniger stürmisch ein. Die entwicklungsbeschleunigende Wirkung kommt dadurch stärker zur Geltung als bei Einwirkung von Lösungen höherer Konzentration.

3. Bei noch schwächerer Konzentration der Lösung (1 : 100000000) und gleicher Einwirkungsweise wird anfänglich die Entwicklung der Extremitäten noch leicht beschleunigt. Nach einiger Zeit tritt jedoch ein Stillstand ein, der schließlich sogar zu einer beträchtlichen Entwicklungshemmung führt, die sich in einer Verzögerung der Metamorphose auswirkt. Die Rückbildung der larvalen Organe ist nur sehr unvollkommen, so daß diese Tiere schließlich das Äußere neotenischer Larven zeigen. Das Wachstum ist anfänglich nur leicht gehemmt. Allmählich bleibt die Durchschnittsgröße der Tiere infolge des verlangsamten Wachstums jedoch immer stärker zurück, bis etwa 1½ Monate nach der Einwirkung eine Durchschnittsdifferenz von 16 mm erreicht ist. Im weiteren Verlaufe verringert sich dieser Unterschied infolge des fortdauernden, wenn auch verlangsamten Wachstums der Versuchstiere, zumal ja auch das Wachstum der normalen Vergleichstiere nach Erreichen eines bestimmten Maximalpunktes Halt macht.

4. Die Variationsbreite zwischen größten und kleinsten Tieren einer Gruppe wird durch die Einwirkung stark verdünnter Thyroxinlösungen (1 : 100000000) wesentlich erhöht. Die individuellen Unterschiede in der Empfänglichkeit für Thyroxin treten bei Einwirkung schwächster Lösungen viel deutlicher hervor als bei stärkeren.

5. Selbst in einer Verdünnung von 1 : 1000000000 übt das Thyroxin noch einen leichten Einfluß aus, der in einer Hemmung des Wachstums und einer leichten Verzögerung der Metamorphose zum Ausdruck kommt.

6. Bei einem Vergleich zwischen Thyroxin und Dijodtyrosin zeigt sich das erstere beträchtlich überlegen. Der „Schilddrüseneffekt“ tritt nach dessen Einwirkung sowohl rascher wie auch stärker hervor. Unter den vorliegenden Bedingungen entspricht die Wirkung einer Thyroxinlösung von 1 : 10000000 jener einer Dijodtyrosinlösung von 1 : 100000. Abgesehen vom Unterschiede der nötigen Konzentration der Lösungen stimmen die durch beide Substanzen hervorgerufenen Veränderungen äußerlich überein.

7. Nach Einwirkung einer Dijodtyrosinlösung von 1 : 1000000 und 1 : 10000000 kommt es auch hier nach einer anfänglichen leichten Entwicklungsbeschleunigung zu einer Entwicklungs- wie Wachstumshemmung.

8. Die Wirkung von Jodothyrin und Jodthyreoglobulin ist der des Thyroxins beträchtlich unterlegen. In einer Konzentration von 1 : 100000 veranlassen sie unter den vorliegenden Versuchsbedingungen nur kurz nach der Einwirkung eine geringe Entwicklungsbeschleunigung. Der

Ablauf der Metamorphose erscheint bei dieser wie der nächstfolgenden Verdünnung etwas hinausgezögert. Das Wachstum wird nicht wesentlich beeinflußt.

9. Thyroxin wie Dijodtyrosin kann bei gleicher Einwirkungsweise je nach dem Grade der Verdünnung entgegengesetzte Wirkungen hervorrufen. Der kritische Punkt, an dem die Umkehr der Wirkung eintritt, wird, abgesehen von der Konzentration, auch durch die Zeitdauer und die Zahl der Einwirkungen beeinflußt.

Versuch 583.

Material: wie bei Versuch 573. Die Larven wurden bis zu Versuchsbeginn bei leicht fließendem Wasser in einem großen, mit Kies belegten Aquarium gehalten, in dem sich reichlich Quellmoos befindet. Zur Ernährung der Tiere werden Froschschenkel in das Wasser gehängt.

Beginn des Versuchs: 2. Mai 1922. Alter der Tiere: 48 Tage.

Entwicklungsstadium: Große, kräftige Tiere mit voll ausgebildeten larvalen Organen. Die Anlagen der Hinterbeine sind zwar noch klein (Länge 1 bis 1,5 mm) aber bereits in Fußplatte, Unter- und Oberschenkel gegliedert.

Anzahl der Tiere: 17 Gruppen zu je 12 Tieren.

Versuchsanordnung.

Gruppe	a:	Kontrolle: Muskel und Pflanzen.	
,,	b:	Thyroxin	1: 1000000
,,	c:	,, ...	1: 10000000
,,	d:	,, ...	1: 100000000
,,	e:	,, ...	1: 1000000000
,,	f:	Dijodtyrosin	1: 100000
,,	g:	,, ...	1: 1000000
,,	h:	,, ...	1: 10000000
,,	i:	,, ...	1: 100000000
,,	k:	Jodothyrin	1: 100000
,,	l:	,, ...	1: 1000000
,,	m:	,, ...	1: 10000000
,,	n:	,, ...	1: 100000000
,,	o:	Jodthyreoglobulin. . . .	1: 100000
,,	p:	,, ...	1: 1000000
,,	qu:	,, ...	1: 10000000
,,	r:	,, ...	1: 100000000

Die Einwirkung der Lösungen erfolgt wie in Versuch 573 zweimal, und zwar das erste Mal für 48 Stunden, das zweite Mal nur für die Dauer von 24 Stunden. Die Wassermenge beträgt an diesen Tagen in den Schalen je 500 ccm, während der ganzen übrigen Versuchsdauer 1000 ccm. Die Tiere sämtlicher Gruppen werden gleichmäßig mit gekochtem Froschmuskel, Salat und Quellmoos gefüttert. Das Wasser der Schalen wird im allgemeinen an jedem dritten Tag erneuert.

2. Mai. Erste Einwirkung der Lösungen. — 4. Mai. Wasserwechsel. — 6. Mai. Zweite Einwirkung der Lösungen. Sowohl in Gruppe b wie c machen sich bereits typische Symptome der Schilddrüsenwirkung bemerkbar,

besonders in Gruppe b fällt eine starke Verschmälerung des Rumpfes und der Flossensäume auf. An der Schwanzspitze beginnt die Gewebseinschmelzung. Die Entwicklung der Extremitäten ist beschleunigt. In Gruppe c sind die Symptome schwächer.

7. Mai. Wasserwechsel. Rasche Steigerung der Schilddrüsenwirkung in Gruppe b. Die Einschmelzung des Schwanzes macht rapide Fortschritte. Die Hornkiefer sind bei allen Tieren der Gruppe abgeworfen, die Lippen, Papillen usw. stark reduziert. Ein Tier der Gruppe ist tot.

8. Mai. Weitere Verstärkung der Thyroxinwirkung in Gruppe b. Über das Aussehen der Tiere orientiert Abb. 6a, aus der die starke Einschmelzung des Schwanzes deutlich hervorgeht. Bei drei Tieren ist das linke Vorderbein infolge der Resorption des Operculums sichtbar geworden. Der Kopf ist stark froschähnlich verändert. Das ödematöse Aussehen der Tiere hängt wohl damit zusammen, daß die in dem außerordentlich wasserreichen Gewebe der Froschlarve enthaltene Flüssigkeit bei der überstürzten Reduktion

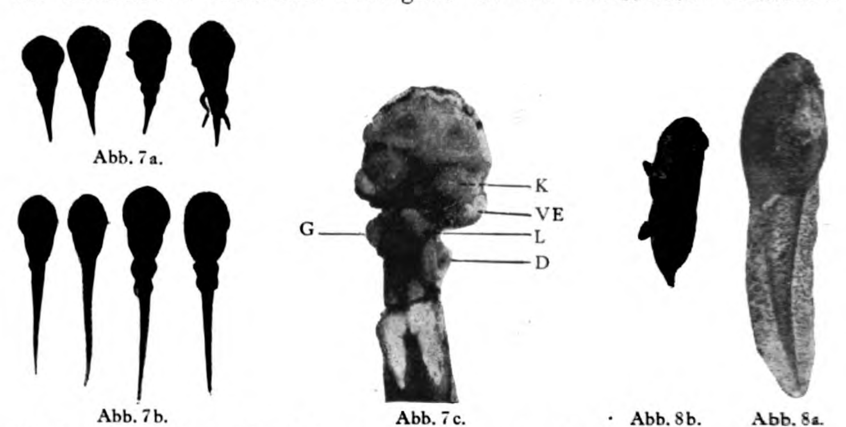


Abb. 7. Versuch 583. 54tägige Kaulquappen (rana temporaria). Versuchsbeginn 2. 5. 1922. Aufgenommen am 8. 5. 1922. Natürliche Größe. — 7a: Gruppe b, Thyroxin 1:1000000 (2×). — 7b: Gruppe c, Thyroxin 1:10000000 (2×). — 7c: Gruppe b. Vergrößerung 1:4. G = Gallenblase, D = Darm, K = innere Kiemen, L = Leber, VE = Vordere Extremität.

Abb. 8. Versuch 583. 61tägige Tiere. Versuchsbeginn 2. 5. 1922. Aufgenommen am 15. 5. 1922. Vergrößerung 1:2. — 8a: Gruppe a, Kontrolle. — 8b: Gruppe c, Thyroxin 1:10000000 (2×).

nicht rasch genug ausgeschieden werden kann. Den Einfluß auf die Bauchorgane zeigt Abb. 7c, die nach Wegnahme der Bauchdecken bei vierfacher Vergrößerung besonders an der stark verkleinerten Darmspirale und der übermäßig stark gefüllten Gallenblase die charakteristische Schilddrüsenwirkung erkennen läßt. Schwächer als in Gruppe b ist die Wirkung in Gruppe c (siehe Abb. 7b). Die Einschmelzungsprozesse verlaufen hier langsamer. Bis zum Abend sind fünf Tiere der Gruppe b gestorben. Die übrigen sind sehr schwächlich und werden daher zur weiteren Untersuchung fixiert (Nr. 3557 bis 3561; dazu zum Vergleich aus der Gruppe a: Nr. 3562 bis 3564).

9. Mai. Die Tiere der Gruppe c haben die Hornkiefer abgeworfen. Die Reduktionsprozesse schreiten fort. Ein Tier ist tot.

10. Mai. Bei vier Tieren der Gruppe c ist das linke Vorderbein durchgebrochen, bei einem weiteren rechtes und linkes. Die Extremitäten sind größer und besser differenziert als die der Kontrolltiere. Die Ruderschwänze

sind stark verkleinert, aber noch nicht so stark wie es zwei Tage früher bei den Tieren der Gruppe b der Fall war. Die Tiere sind sehr sauerstoffbedürftig. Ihre Pigmentierung ist ganz froschähnlich geworden. Fixierung eines Tieres der Gruppe c: Nr. 3565.

11. Mai. In Gruppe c sind zwei Tiere tot. Das linke Vorderbein ist nunmehr bei allen Tieren, bis auf zwei, zum Vorschein gekommen; bei dreien ist auch das rechte durchgebrochen. In der Nacht sterben weitere fünf Tiere.

13. Mai. In Gruppe c leben noch drei Tiere; bei einem derselben sind beide Vorderbeine, bei den zwei anderen nur das linke frei.

14. Mai. Gruppe c: ein Tier mit zwei freien Vorderbeinen tot. In Gruppe d ist die Entwicklung der Extremitäten beschleunigt. Die larvalen Merkmale sind jedoch nicht beeinflußt. In Gruppe e ist keine besondere Wirkung zu erkennen. In Gruppe f ist eine leichte Beschleunigung der Extremitätenentwicklung festzustellen, ebenso in Gruppe o; die larvalen Organe sind aber noch voll entwickelt. In den übrigen Gruppen ist nichts Wesentliches zu erkennen.

15. Mai. Bei den zwei letzten Tieren der Gruppe c sind beide Vorderbeine frei sichtbar. Das eine Fröschchen stirbt im Laufe des Vormittags;

Tabelle VI.

Gruppe a	Gruppe d	Gruppe e	Gruppe f	Gruppe g	Gruppe h	Gruppe i
Kontrolle	Thyroxin		Dijodtyrosin			
	1:100000000	1:1000000000	1:100000	1:1000000	1:10000000	1:100000000
29,5	26,9	31,2	29,0	27,0	26,5	27,0
29,6	27,1	31,2	29,6	27,9	29,4	27,1
30,5	27,2	31,5	30,0	28,6	29,5	28,0
30,5	27,2	31,9	30,2	29,2	29,5	28,6
31,0	28,2	32,0	30,5	29,8	29,5	29,5
31,4	28,7	32,5	31,0	30,0	30,0	30,4
31,6	29,6	33,5	31,0	30,1	30,0	30,5
32,0	30,1	34,2	31,4	30,6	30,1	31,5
32,5		30,0	32,8	30,8	31,5	31,6
32,5				31,5	31,5	
31,0	28,1	32,0	30,6	29,6	29,8	29,3

Gruppe k	Gruppe l	Gruppe m	Gruppe n	Gruppe o	Gruppe p	Gruppe qu	Gruppe r
Jodothyrin				Jodthyreoglobulin			
1:100000	1:1000000	1:10000000	1:100000000	1:100000	1:1000000	1:10000000	1:100000000
28,0	29,0	27,5	28,5	26,0	27,0	29,0	28,5
28,2	30,6	28,8	29,1	27,5	27,6	29,0	28,7
28,7	31,0	29,2	29,2	28,1	29,1	29,6	29,0
28,8	31,2	30,0	29,8	29,9	29,5	29,6	29,0
29,0	31,2	30,0	30,0	30,0	29,6	30,0	29,2
29,0	31,5	30,0	30,5	30,1	30,1	30,4	29,3
30,0	32,0	30,5	30,6	30,5	30,1	30,5	30,2
30,0	32,1	31,7	32,0	31,0	30,5	30,7	31,6
30,2	32,5	32,1			30,7	31,0	31,8
	32,5	32,6				31,5	
29,1	31,4	30,1	29,9	29,1	29,3	30,1	29,7

das zweite (Nr. 3569) wird vor der Fixierung zusammen mit einer Kontrolllarve bei zweifacher Vergrößerung photographiert (vgl. Abb. 7a und b). Die Entwicklung der Extremitäten ist wesentlich beschleunigt. Die Abbildung läßt auch die froschähnliche Umbildung des Kopfes und das aufgedunsene Aussehen des Tieres deutlich erkennen. In Gruppe d ist dagegen von dieser resorptiven Wirkung nichts zu beobachten; es besteht lediglich eine geringe Beschleunigung der Extremitätenentwicklung. Auch das Wachstum zeigt keine nennenswerte Beeinflussung.

20. Mai. Sämtliche Gruppen werden photographiert und gemessen. Die Unterschiede in der Gesamtlänge sind demnach zwischen den einzelnen Gruppen nur gering, so daß ich ihnen kein besonderes Gewicht beilegen möchte. Nur in Gruppe d sind die Tiere etwas kleiner. Auch die Rumpfmaße zeigen keine wesentlichen Differenzen, weshalb auf ihre Wiedergabe verzichtet wurde. Ähnlich steht es hinsichtlich der Entwicklung, die in den noch vorhandenen Gruppen ziemlich gleichmäßig ist. In allen Gruppen besitzen zwei bis vier Kaulquappen große, in Sprungstellung stehende Hinterbeine, während die übrigen in der Entwicklung noch weiter zurück sind. In den Gruppen d und o sind bei zweien die Vorderbeine durchgebrochen, in Gruppe e, f, h, k, n und r hat sich je ein Tier verwandelt. Die Maße dieser metamorphosierten Tiere sind in Tabelle VI nicht mit aufgeführt. Es wäre jedoch verfehlt, daraus auf eine in diesen Gruppen bestehende Entwicklungsbeschleunigung zu schließen, da in den nächsten Tagen auch in den übrigen Gruppen ein Teil der Tiere metamorphosiert. Die nachfolgende Abb. 9, in welcher die von 20. Mai bis 3. Juni stattfindenden Metamorphosen eingetragen sind, zeigt vielmehr, daß höchstens in Gruppe d, e und l eine leichte Beschleunigung festzustellen ist. Gerade das Verhalten der Gruppe l läßt es aber möglich erscheinen, daß bei diesen kleineren Schwankungen zufällige individuelle Unterschiede mit beteiligt sind. Eher könnte man in Gruppe i und r eine leichte Verzögerung annehmen, obwohl auch diese Unterschiede sehr geringfügig sind.

Ergebnisse des Versuchs 588.

1. *Die zweimalige Einwirkung einer Thyroxinlösung 1 : 1000000 auf ältere Rana temporaria-Larven (48 Tage alt) verursacht in kürzester Zeit Entwicklungsbeschleunigung, Wachstumshemmung und Abbau larvaler Organe.*

2. *Eine Thyroxinlösung von 1 : 10000000 wirkt unter gleichen Versuchsbedingungen ebenfalls noch sehr stark spezifisch, aber langsamer.*

3. *Durch eine Verdünnung von 1 : 100000000 wird noch leichte Entwicklungsbeschleunigung hervorgerufen. Das Wachstum wird nicht beeinflußt.*

4. *Eine Verdünnung von 1 : 1000000000 hat unter den vorliegenden Versuchsbedingungen keinen wesentlichen Einfluß.*

5. *Dijodtyrosin, Jodothyrin* und *Jodthyreoglobulin veranlassen nach zweimaliger Einwirkung auf 48tägige Froschlarven in einer Verdünnung von 1 : 100000 ganz geringe Entwicklungsbeschleunigung, ohne daß jedoch die später folgende Metamorphose beeinflußt wird. Das Wachstum wird in leichtem Grade gehemmt.*

6. In einer Konzentration von 1 : 1000000 und schwächer rufen die letztgenannten Substanzen bei der vorliegenden Art der Einwirkung keine wesentlichen und charakteristischen Veränderungen hervor.

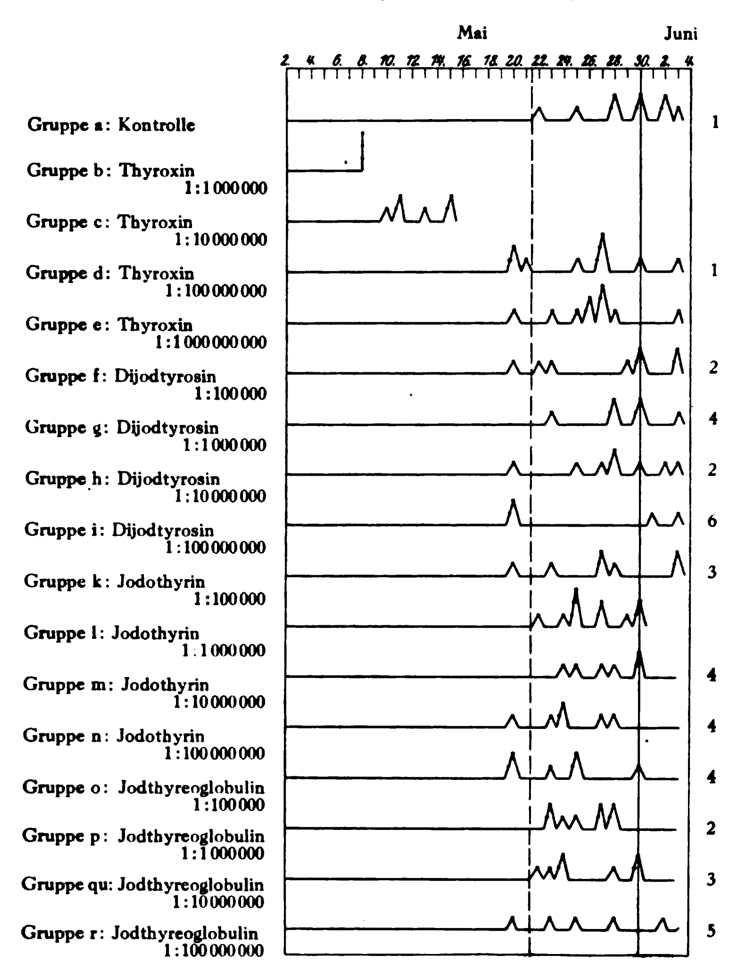


Abb. 9. Der Durchbruch *beider* Vorderbeine ist in der Kurve durch eine Zacke dargestellt. Bricht dagegen, wie es z. B. in Gruppe b der Fall ist, nur *eines* der beiden Vorderbeine durch, so ist statt dessen eine Senkrechte eingezeichnet. Aus der auf der Zacke bzw. Senkrechten eingetragenen Anzahl von Punkten ist die Zahl der an dem betreffenden Tage metamorphosierten Tiere abzulesen.

Versuchsprotokoll Nr. 582.

Material: Rana temporaria-Larven aus einem am 10. April 1922 gelegten Laichballen gezüchtet.

Beginn des Versuchs: 20. April 1922. Alter der Tiere: 10 Tage.

Entwicklungsstadium: Die äußeren Kiemen sind eben überwachsen, die Aftermembran noch nicht durchgebrochen. Die Extremitätenanlagen sind noch nicht sichtbar.

Anzahl der Tiere: Vier Gruppen zu je 25 Tieren.

Versuchsanordnung.

Gruppe	a:	Kontrolle.	
,,	b:	Thyroxin	1:5000000000
,,	c:	Jodthyreoglobulin	1:5000000000
,,	d:	Dijodtyrosin	1:5000000000

Die Tiere befinden sich vom 20. April ab ständig in 1000 ccm dieser Lösungen; dieselben werden dadurch bereitet, daß jeden dritten Tag unmittelbar nach dem Wasserwechsel den betreffenden Schalen je 2 ccm der entsprechend verdünnten Stammlösungen zugesetzt werden. Die Einwirkung erfolgt im ganzen 25 mal. Im übrigen werden die Tiere sämtlicher Gruppen gleichmäßig mit Fleisch und Quellmoos gefüttert.

20. April. Beginn. — 21. April. Die Kloakenmembran ist bei allen Tieren durchgebrochen. — 25. April. Die Extremitätenanlagen sind mit der Lupe als kleine weißliche Verdickungen zu erkennen.

2. Mai. Von jeder Gruppe werden fünf Tiere weggenommen und zum Teil fixiert (Gruppe a: Nr. 3534 bis 3538; Gruppe b: Nr. 3539 bis 3543; Gruppe c: Nr. 3544 bis 3547; Gruppe d: Nr. 3548 bis 3551). Irgendwelche Unterschiede sind auch bei Lupenbetrachtung noch nicht zu erkennen.

6. Mai. Die Tiere der Gruppe b sehen etwas größer aus. Aus Gruppe a und b wird je ein Tier fixiert (Nr. 3552 und 3553).

13. Mai. Die Kaulquappen der einzelnen Versuche werden photographiert und gemessen (siehe Tabelle VII).

Danach sind Durchschnitts- wie auch Einzelmaße der Larven in Gruppe b etwas höher als in den übrigen Gruppen. Der Unterschied ist jedoch noch sehr gering, so daß er, wenn er durch die späteren Messungen nicht in verstärktem Maße bestätigt würde, zurzeit auch zufälliger Natur sein könnte. — 20. Mai. Befund unverändert.

Am 27. Mai werden die einzelnen Gruppen wieder photographiert und gemessen (siehe Tabelle VIII).

Die Kaulquappen der Gruppe b übertreffen die übrigen Larven an Größe. Auch die Extremitätenanlagen sind in dieser Gruppe um durchschnittlich 0,5 mm länger. Sie zeigen den Beginn einer Gliederung in Oberschenkel und Unterschenkel, während die der übrigen Gruppen noch etwa 0,5 bis 1 mm lange undifferenzierte Anlagen darstellen. Die Anzahl der Tiere wird in sämtlichen Gruppen durch Entfernung der kleinsten Tiere gleichmäßig auf je 13 vermindert.

2. Juni. Die Tiere der Gruppe b sind noch immer größer wie auch weiter entwickelt als die der übrigen Gruppen, ohne daß sie jedoch vom typischen Aussehen normaler Larven abweichen würden.

12. Juni. Bei einem Tier der Gruppe b sind beide Vorderbeine durchgebrochen; das Fröschchen ist völlig normal entwickelt. Ein Teil der Kontrolltiere macht einen schwächlichen Eindruck.

15. Juni. In Gruppe b haben sich zwei weitere Tiere verwandelt; in Gruppe d eins. — 17. Juni. Gruppe b: ein Tier metamorphosiert. — 18. Juni. Desgleichen. Aus Gruppe a, b und d werden einige Tiere zur histologischen Untersuchung fixiert (Gruppe a: Nr. 3814; Gruppe b:

Tabelle VII.

Gesamtlänge	Rumpflänge	Schwanzlänge	Gesamtlänge	Rumpflänge	Schwanzlänge	Gesamtlänge	Rumpflänge	Schwanzlänge	Gesamtlänge	Rumpflänge	Schwanzlänge
Gruppe a: Kontrolle			Gruppe b: Thyroxin 1 : 5 000 000 000			Gruppe c: Jodthyreoglobulin 1 : 5 000 000 000			Gruppe d: Dijodtyrosin 1 : 5 000 000 000		
18,0	6,5	11,5	19,0	7,0	12,0	19,0	7,3	11,7	18,0	6,5	11,5
18,0	7,0	11,0	19,6	7,6	12,0	19,1	7,1	12,0	18,0	7,0	11,0
18,5	7,0	11,5	20,0	7,0	13,0	19,6	7,5	12,1	18,5	7,0	11,5
19,5	7,4	12,1	20,6	7,8	12,8	19,6	7,5	12,1	18,6	7,0	11,6
20,0	7,5	12,5	20,7	8,0	12,7	20,0	7,5	12,5	19,0	7,0	12,0
20,5	7,4	13,1	20,7	8,0	12,7	20,0	7,7	12,3	19,0	7,0	12,0
20,6	7,5	13,1	21,0	8,0	13,0	20,5	7,5	13,0	19,0	7,0	12,0
20,6	8,0	12,6	21,0	8,0	13,0	20,5	7,5	13,0	19,2	7,0	12,2
20,7	7,5	13,2	21,0	8,0	13,0	20,5	8,0	12,5	19,2	7,0	12,2
20,8	7,9	12,9	21,0	8,0	13,0	20,7	7,6	13,1	19,5	7,5	12,0
21,0	7,4	13,6	21,0	8,2	12,8	21,0	7,9	13,1	19,6	7,1	12,5
21,0	7,5	13,5	21,0	8,5	12,5	21,0	8,0	13,0	20,0	7,5	12,5
21,5	7,5	14,0	21,1	7,6	13,5	21,0	8,1	12,9	20,3	7,7	12,6
21,5	8,1	13,4	21,2	8,0	13,2	21,1	7,7	13,4	20,5	7,5	13,0
21,6	8,2	13,4	21,5	8,0	13,5	21,3	8,0	13,3	20,5	7,6	12,9
21,6	8,3	13,3	21,5	8,1	13,4	21,6	8,0	13,6	21,0	7,6	13,4
22,0	8,0	14,0	21,6	8,0	13,6	22,0	8,5	13,5	21,5	7,6	13,9
22,1	8,0	14,1	22,8	9,2	13,6	22,0	8,6	13,4	21,5	8,0	13,5
20,5	7,6	12,9	20,9	7,9	12,9	20,5	7,7	12,8	19,6	7,2	12,4

Tabelle VIII.

Gesamtlänge	Rumpflänge	Schwanzlänge	Gesamtlänge	Rumpflänge	Schwanzlänge	Gesamtlänge	Rumpflänge	Schwanzlänge	Gesamtlänge	Rumpflänge	Schwanzlänge
Gruppe a: Kontrolle			Gruppe b: Thyroxin 1 : 5 000 000 000			Gruppe c: Jodthyreoglobulin 1 : 5 000 000 000			Gruppe d: Dijodtyrosin 1 : 5 000 000 000		
24,5	9,0	15,5	26,0	9,0	17,0	24,5	9,0	15,5	23,0	9,0	14,0
25,0	9,3	15,7	26,0	9,5	16,5	25,0	8,6	16,4	23,2	9,0	14,2
25,2	9,5	15,7	26,0	10,0	16,0	25,0	9,5	15,5	24,2	8,5	15,7
25,5	9,5	16,0	26,0	10,0	16,0	25,5	9,5	16,0	24,5	9,0	15,5
25,5	9,5	16,0	27,0	10,3	16,7	25,5	9,6	15,9	24,5	9,0	15,5
25,5	9,6	15,9	27,0	10,4	16,6	25,5	10,0	15,5	24,6	9,0	15,6
25,5	9,8	15,7	27,5	10,2	17,3	25,8	9,0	16,8	25,0	9,2	15,8
26,0	9,7	16,3	28,0	10,7	17,3	26,0	9,0	17,0	25,0	9,2	15,8
26,5	10,0	16,5	28,2	10,5	17,7	26,0	9,0	17,0	25,5	9,5	16,0
27,0	10,0	17,0	28,2	10,6	17,6	26,0	9,1	16,9	26,0	9,8	16,2
27,0	10,2	16,8	28,5	10,1	18,4	26,0	9,6	16,2	26,1	9,1	17,0
27,5	10,2	17,3	28,5	10,5	18,0	26,0	9,8	16,4	26,6	10,1	16,5
28,0	10,1	17,9	29,0	10,8	18,2	26,1	9,7	16,4	27,0	10,0	17,0
			29,0	11,0	18,0	26,2	9,6	16,6	27,6	10,0	17,6
			29,0	11,0	18,0	26,5	9,6	16,9	28,5	10,0	18,5
						27,2	9,6	17,6			
26,0	9,7	16,3	27,5	10,3	17,2	25,8	9,4	16,4	25,4	9,3	16,1

Nr. 3815; Gruppe d: Nr. 3816 und 3817; das letztere Tier steht unmittelbar vor der Metamorphose; es ist in Kurve 3 als am 19. metamorphosiert eingetragen).

20. Juni. Die noch vorhandenen Kaulquappen werden einschließlich der tags vorher metamorphosierten Fröschchen photographiert. Die Maße der Tiere sind in Tabelle IX zusammengestellt. Bei den mit einem × bezeichneten Tieren sind die Vorderbeine durchgebrochen. Da ihre Größe infolge der Rückbildungsvorgänge mehr oder weniger reduziert ist, so bleiben deren Maße bei der Ermittlung der Durchschnittsziffern unberücksichtigt.

Die Tiere der Gruppe b stehen hinsichtlich ihrer Körpergröße also auch jetzt noch an erster Stelle. Dann folgt Gruppe c, während das Wachstum der Gruppe d hinter dem der Kontrolle zurückgeblieben ist. Was die Entwicklung anbelangt, so ist auch hierin die Gruppe b den übrigen Gruppen des Versuchs überlegen. Die kräftig gebauten Thyroxintiere zeigen im übrigen normale Proportionen und lassen die bei der Einwirkung starker Thyroxindosen auftretenden Mißbildungen völlig vermissen. Geringer ist der fördernde Einfluß in Gruppe c und d, obwohl auch in diesen die Entwicklung weiter fortgeschritten ist als in der Kontrollgruppe, in der die überwiegende Zahl der Tiere noch ganz kleine, 1 bis 3 mm große Extremitätenanlagen besitzt.

Tabelle IX.

Gesamtlänge	Rumpflänge	Rumpfbreite	Schwanzlänge	Gesamtlänge	Rumpflänge	Rumpfbreite	Schwanzlänge
Gruppe a: Kontrolle				Gruppe b: Thyroxin 1 : 5 000 000 000			
28,6	10,0	6,0	18,6	×23,0	11,0	5,5	12,0
28,6	10,2	6,2	18,4	×25,0	11,0	5,5	14,0
29,3	10,5	7,0	18,8	31,0	10,5	6,7	20,5
29,5	11,0	6,9	18,5	32,7	11,5	7,0	21,2
×29,5	10,5	5,8	19,0	34,0	11,0	7,2	23,0
30,0	10,2	6,5	19,8	34,5	12,0	7,5	22,5
30,5	10,5	6,3	20,0	35,0	12,0	7,2	23,0
31,0	10,5	6,5	20,5				
32,7	11,5	7,0	21,2				
33,4	12,0	6,7	21,4				
35,0	12,0	7,5	23,0				
30,9	10,9	6,7	20,0	33,4	11,4	7,1	22,0
Gruppe c: Jodthyreoglobulin 1 : 5 000 000 000				Gruppe d: Dijodtyrosin 1 : 5 000 000 000			
29,0	10,2	6,0	18,8	×25,5	10,0	5,7	15,5
×30,6	10,7	6,5	19,9	×25,6	10,5	6,0	15,1
31,0	10,6	7,0	20,4	×27,0	10,0	6,0	17,0
32,2	11,5	6,7	20,7	27,2	10,0	6,2	17,2
32,2	11,0	7,0	21,2	27,2	10,5	6,7	16,7
×32,6	11,0	6,5	21,6	27,2	10,0	6,5	17,2
33,0	11,0	6,5	22,0	28,2	10,0	6,0	18,2
33,0	11,5	7,2	21,5	28,7	10,5	6,8	18,2
34,0	10,6	6,7	23,4	29,6	11,0	6,6	19,0
35,0	12,0	6,7	23,0	30,0	11,0	7,0	18,6
35,0	11,4	7,0	23,6				
35,5	11,5	6,8	24,0				
32,9	11,1	6,7	21,8	28,3	10,4	6,5	17,9

Der Zeitpunkt des Durchbruches der Vorderbeine ist in Abb. 10 übersichtlich zusammengestellt. Der Umstand, daß in der Kontrollgruppe bei Abbruch des Versuchs am 12. Juli 1922 noch sechs in der Entwicklung

stark zurückgebliebene Larven leben, deutet darauf hin, daß die zu dem Versuche benutzten Tiere im allgemeinen in ihrer Entwicklung etwas gehemmt waren und Neigung zu Neotenie hatten. Vielleicht hängt das damit zusammen, daß die Tiere einem Spätlaich entstammen. Um so deutlicher kommt die entwicklungsanreizende Wirkung der in den übrigen Gruppen zur Einwirkung gelangten Substanzen, insbesondere des Thyroxins, zum Ausdruck.

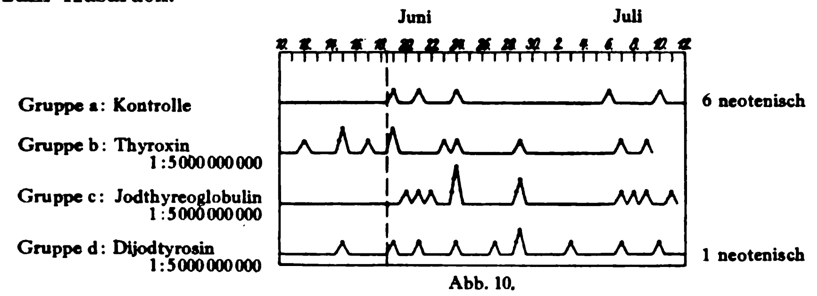


Abb. 10.

Zur histologischen Untersuchung werden am 20. Juni aus Gruppe a das am 19. Juni metamorphosierte Fröschchen Nr. 3818, das unmittelbar vor der Metamorphose stehende und in der Kurve als am 21. Juni metamorphosiert eingetragene Tier Nr. 3819 und eine in der Entwicklung stark zurückgebliebene Kaulquappe Nr. 3820 fixiert; aus Gruppe b: die beiden tags vorher metamorphosierten Fröschchen Nr. 3821 und 3822 und ein weiteres Nr. 3823; aus Gruppe d: Nr. 3824.

Ergebnisse des Versuchs 582.

1. Durch die dauernde Einwirkung einer äußerst stark verdünnten Thyroxinlösung (Konzentration 1: 5000000000) wird Wachstum und Entwicklung von Rana temporaria-Larven günstig beeinflußt.

2. Die in dieser Weise erhaltenen Fröschchen sind äußerlich vollkommen normal ausgebildet, wohlproportioniert und lebensfähig.

3. Auch Jodthyreoglobulin und Dijodtyrosin begünstigen in der genannten Konzentration bei dauernder Einwirkung die Entwicklung; das Wachstum wird durch Dijodtyrosin jedoch in leichtem Grade gehemmt. Jodthyreoglobulin und Dijodtyrosin fördern die Entwicklung auch in diesem Falle schwächer als eine Thyroxinlösung der gleichen Konzentration.

Versuchsprotokoll Nr. 586.

Material: Rana temporaria-Larven aus einem am 14. April 1922 abgelegten Laichballen.

Beginn des Versuchs: 17. Mai 1922. Alter der Tiere: 33 Tage.

Entwicklungsstadium: Große, kräftige Tiere mit 0,5 mm großen, noch völlig undifferenzierten Extremitätenstummeln.

Anzahl der Tiere: Sechs Gruppen zu je 12 Tieren.

Versuchsanordnung.

Gruppe a:	Kontrolle.		
,, b:	Frische Schilddrüsen vom Kalb.		
,, c:	Thyroxin	. . . .	1: 50000000
,, d:	,,	. . . .	1:100000000
,, e:	Dijodtyrosin	. . . . . .	1: 50000000
,, f:	,,	. . . . . .	1: 1000000

Die Wassermenge beträgt in jeder Schale je 1000 ccm, an den Tagen der spezifischen Behandlung aber nur je 500 ccm. Die Lösungen wirken jeweils 24 Stunden lang ein. Während der übrigen Zeit werden die Tiere gleichmäßig mit gekochtem Muskelfleisch und Quellmoos gefüttert. Die frische Schilddrüsensubstanz (1 g Frischgewicht) wird zur Fütterung in 10 bis 15 kleine Stückchen zerschnitten. Thyroxin und Dijodtyrosin werden vorher wie bei Versuch 573 durch Zusatz von etwas NaOH klar gelöst.

17. Mai. *Erste Schilddrüsenfütterung* und Einwirkung der Lösungen. – 18. Mai. Wasserwechsel. – 19. Mai. Die Tiere der Gruppe b sind um geringes größer als die Kontrollkaulquappen.

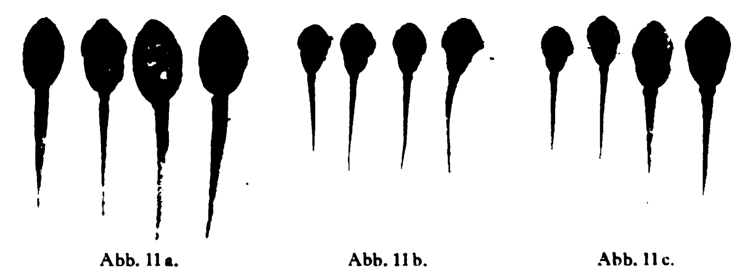


Abb. 11a. Abb. 11b. Abb. 11c.

Abb. 11. Versuch 586. 48tägige Kaulquappen (rana temporaria). Versuchsbeginn 17. 5. 1922. Aufgenommen am 1. 6. 1922. Natürliche Größe. 11a: Gruppe a, Kontrolle. — 11b: Gruppe b, frische Schilddrüse (3×). — 11c: Gruppe c, Thyroxin 1:50000000 (3×).

20. Mai. *Zweite Einwirkung von Thyreoidea* usw. Wie am 17. bis 21. Mai. Wasserwechsel. – 22. Mai. In Gruppe b sind die Larven deutlich schmäler geworden; ebenso in Gruppe c. In Gruppe d, e und f noch keine Wirkung.

28. Mai. Die charakteristische Schilddrüsenwirkung tritt in Gruppe b am stärksten hervor; nach ihr folgt Gruppe c und dann d. In Gruppe e und f sind die Kaulquappen im Wachstum etwas zurückgeblieben.

Dritte spezifische Einwirkung. Dosierung wie oben. – 29. Mai. Wasserwechsel. – 30. Mai. In Gruppe b sind vier Tiere tot.

1. Juni. In sämtlichen Versuchsgruppen sind nunmehr gegenüber den Kontrolltieren Veränderungen zu beobachten, ihre Stärke ist aber in den einzelnen Gruppen sehr verschieden. Wie die bei der Ausmessung der Photographien erhaltenen und in Tabelle X zusammengestellten Maße erweisen, ist das Wachstum in Gruppe b und c am stärksten gehemmt (vgl. Abb. 8a, b, c), bei Gruppe b durchschnittlich sogar etwas mehr als in Gruppe c, da sich in letzterer noch einige kräftige, schwächer beeinflußte Tiere befinden. Bei beiden Gruppen ist die Differenzierung wie das Wachstum der Extremitäten deutlich beschleunigt, in Gruppe c stärker als in Gruppe b. Die Beinanlagen sind daher in Gruppe c nicht nur besser differenziert, sondern auch größer, obwohl die Körpergröße erheblich unter jener der Kontrolltiere liegt. Der Abbau der larvalen Organe ist dagegen in Gruppe b

Tabelle X.

Gesamtlänge	Rumpflänge	Rumpfbreite	Schwanzlänge	Gesamtlänge	Rumpflänge	Rumpfbreite	Schwanzlänge
Gruppe a: Kontrolle				Gruppe b: frische Schilddrüse			
25,0	9,5	5,8	15,5	15,2	7,2	4,6	8,0
25,0	10,0	6,0	15,0	17,6	6,5	4,3	11,1
25,0	10,0	6,2	15,0	18,2	6,5	4,5	11,7
26,3	10,5	6,0	15,8	19,0	6,7	4,6	12,3
26,5	10,0	6,2	16,5	19,3	7,0	4,5	12,3
26,5	10,3	6,1	16,2	19,5	6,7	4,5	12,8
26,6	10,4	6,0	15,9	21,0	7,5	5,1	13,5
27,4	10,0	6,3	17,4	21,0	7,8	5,1	13,2
27,4	10,5	6,0	16,9				
28,2	11,0	6,6	17,2				
29,0	11,1	6.8	17,9				
26,6	10,3	6,1	16,3	18,8	7,0	4,6	11,8
Gruppe c: Thyroxin 1 : 50 000 000				Gruppe d. Thyroxin 1 : 100 000 000			
16,4	6,2	4,0	10,2	16,0	6,0	4,0	10,0
18,4	6,8	4,5	11,6	21,2	8,0	5,0	13,2
18,6	6,7	4,5	11,9	22,5	8,6	5,2	13,9
18,6	7,0	4,7	11,6	23,0	8,5	5,5	14,5
19,6	7,1	4,5	12,5	24,0	9,0	5,5	15,0
21,0	8,0	5,4	13,0	24,0	8,6	5,4	15,4
23,3	8,0	5,6	15,3	24,5	9,0	5,6	15,5
24,0	8,7	5,9	15,3	24,6	9,0	5,5	15,6
24,5	8,5	5,4	16,0	25,0	9,7	6,0	15,3
25,0	9,1	6,2	15,9	26,0	9,5	5,6	16,5
				26,0	9,7	6,0	16,3
20,9	7,6	5,0	13,3	23,3	8,7	5,4	14,6
Gruppe e: Dijodtyrosin 1 : 50 000 000				Gruppe f: Dijodtyrosin 1 : 1 000 000			
23,8	8,7	5,5	15,1	23,5	9,5	5,8	14,0
24,0	9,7	5,7	14,3	23,6	9,2	6,0	14,4
24,5	9,5	6,0	15,0	24,1	9,5	6,0	14,6
24,6	9,4	5,6	15,2	24,4	9,5	6,0	14,9
25,2	9,8	6,2	15,4	24,5	9,0	5,5	15,5
25.2	9,9	5,7	15,3	24,5	9,6	6,5	14,9
26,0	10,0	6,2	16,0	25,0	10,0	5,9	15,0
26,5	10,0	6,2	16,5	25,5	9,8	6,0	15,7
27,4	10,4	6,5	17,0	25,7	9,8	6,1	15,9
28,6	10,1	6,2	18.5	25,9	9,8	5,9	16,1
29,5	10,2	6.4	19,3	26,5	10,0	6,1	16,5
25,9	9,8	6,0	16,1	24,8	9,6	5,9	15.2

weiter vorgeschritten als in Gruppe c; so fehlen den Tieren der erstgenannten durchgehends Hornkiefer, Lippen und Papillen, während in Gruppe c bei einem Teil der Kaulquappen die larvalen Freßwerkzeuge noch in Fragmenten vorhanden sind. Zu einer Resorption des Operculums ist es bis jetzt weder in Gruppe b noch c gekommen.

Schwächer ist die Wirkung in Gruppe d, deren Tiere im Wachstum zwar ebenfalls gehemmt sind, an den Hornkiefern usw. aber noch keine Defekte aufweisen. Trotz dieser geringeren Rückbildung der larvalen Organe ist aber auch bei ihnen die Entwicklung der Extremitäten wieder deutlich beschleunigt. In den beiden Dijodtyrosingruppen e und f ist dagegen lediglich eine leichte Hemmung des Wachstums festzustellen, in Gruppe f stärker als in e. Die larvalen Organe sind hier ganz unbeeinflußt; die Beinanlagen unterscheiden sich, sowohl was Größe wie Differenzierung anbelangt, nicht wesentlich von der Kontrollgruppe.

2. Juni. *Vierte spezifische Einwirkung.* In Gruppe b sind alle Tiere bis auf drei gestorben. Bei allen sind die Larvalorgane in typischer Weise stark eingeschmolzen. Die drei überlebenden Tiere werden zur späteren vergleichenden histologischen Untersuchung fixiert (Nr. 3701: 54 mg; Nr. 3703: 67 mg; Nr. 3704: 69 mg).

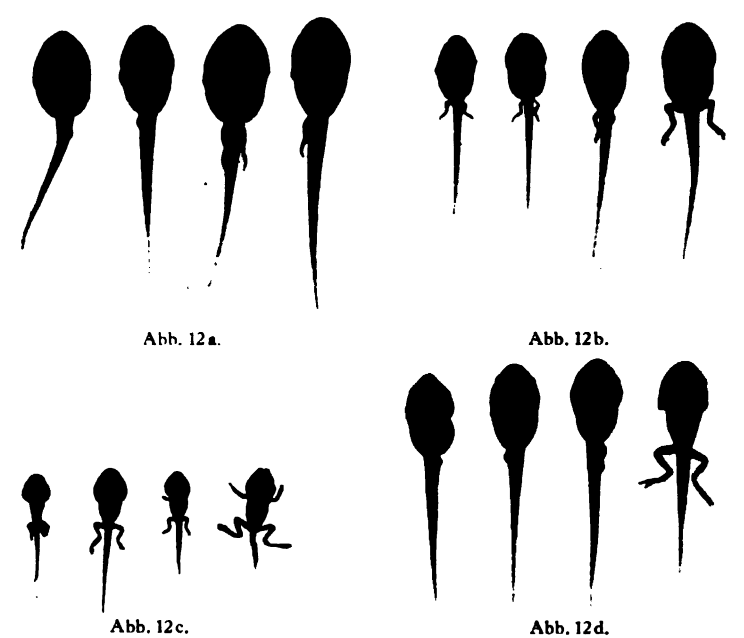


Abb. 12. Versuch 586. 61 tägige Tiere (rana temporaria). Versuchsbeginn 17. 5. 1922. Aufgenommen am 14. 6. 1922. Natürliche Größe. — 12a: Gruppe a, Kontrolle. — 12b: Gruppe c, Thyroxin 1:50000000 (4×). — 12c: Gruppe d, Thyroxin 1:100000000 (4×). — 12d: Gruppe e, Dijodtyrosin 1:50000000 (4×).

3. Juni. Wasserwechsel. — 4. Juni. Die Thyreoideasymptome haben sich in Gruppe c und d in den letzten Tagen verstärkt. Aus jeder Gruppe werden zur weiteren Untersuchung einige der kleinsten und größten Tiere fixiert. Vorher erfolgt die Bestimmung ihres Körpergewichts (s. Tabelle XI).

Der Gewichtsverlust der Thyroxintiere ist demnach sehr bedeutend. Aber auch die beiden unter Einwirkung von Dijodtyrosin stehenden Gruppen e und f weisen niedrigere Werte auf als die Kontrolltiere.

11. Juni. Metamorphose eines Tieres in Gruppe c. — 12. Juni. Desgleichen. — Am 14. Juni werden wieder sämtliche Gruppen photographiert und ausgemessen (siehe Tabelle XII).

Tabelle XI.

Nr.	Gewicht mg	Nr.	Gewicht mg	Nr.	Gewicht mg
Gruppe a: Kontrolle		Gruppe c: Thyroxin 1:50000000		Gruppe d: Thyroxin 1:100000000	
3717	207	3720	39	3724	34
3718	221	3721	45	3725	141
3719	259	3722	103	3726	154
		3723	111		
Gruppe e: Dijodtyrosin 1:50000000		Gruppe f: Dijodtyrosin 1:1000000			
3727	125	3730	154		
3728	192	3731	169		
3729	181	3732	214		

Tabelle XII.

Gesamtlänge	Rumpflänge	Rumpfbreite	Schwanzlänge	Gesamtlänge	Rumpflänge	Rumpfbreite	Schwanzlänge	Gesamtlänge	Rumpflänge	Rumpfbreite	Schwanzlänge
Gruppe a: Kontrolle				Gruppe c: Thyroxin 1 : 50000000				Gruppe d: Thyroxin 1 : 100000000			
30,0	11,5	8,0	18,5	13,0	7,6	4,1	5,4	24,0	9,1	5,6	14,9
33,5	11,5	7,7	22,0	13,2	6,1	3,5	7,1	24,1	9,1	5,7	15,0
33,5	12,5	8,0	21,0	14,0	6,5	3,9	7,5	24,6	9,2	5,7	15,4
34,0	12,2	8,2	21,8	16,4	6,5	3,6	9,9	25,5	10,1	6,0	15,4
34,2	12,0	7,9	22,2	19,1	7,5	4,5	11,6	27,0	9,6	6,3	17,4
35,0	13,0	9,0	22,0	21,0	7,5	4,7	13,5	27,2	9,7	6,1	17,5
40,0	13,4	8,4	26,6					29,5	10,6	6,4	18,9
								30,0	10,7	6,6	19,3
								31,2	11,5	7,4	19,7
34,3	12,3	8,1	22,0	16,1	6,9	4,0	9,2	27,0	9,9	6,2	17,1
Gruppe e: Dijodtyrosin 1 : 50000000				Gruppe f: Dijodtyrosin 1 : 1000000							
30,4	10,9	6,7	19,5	31,4	11,2	7,0	20,2				
31,6	11,0	7,0	20,6	33,0	11,2	6,7	21,8				
32,0	11,0	6,5	21,0	33,0	11,6	7,1	21,4				
32,0	11,3	6,6	20,7	33,5	11,5	7,2	22,0				
32,5	11,5	7,0	21,0	34,4	12,0	7,5	22,4				
34,0	11,0	6,6	23,0	35,5	12,7	7,7	22,8				
34,0	11,5	7,0	22,5	36,5	12,0	7,2	24,5				
34,2	11,6	6,7	22,6								
32,5	11,2	6,7	21,3	33,9	11,7	7,2	22,2				

In Gruppe c, deren Tiere von allen weitaus am kleinsten sind und sehr starke Thyroxinwirkung erkennen lassen (vgl. Abb. 12b gegen Abb. 12a der Gruppe a), sind bei einem der Tiere beide Vorderbeine durchgebrochen. Trotzdem die Kontrolltiere um das Neun- bis Zwölffache größer sind (vgl. insbesondere die Gewichtszahlen in Tabelle XIII), sind die Hinterbeine dieses Fröschchens der Gruppe c nicht nur relativ, sondern auch absolut genommen größer als bei irgend einem Tier der Gruppe a. Auch in Gruppe d,

Tabelle XIII.

Nr.	Gewicht mg	Nr.	Gewicht mg	Nr.	Gewicht mg
Gruppe a: Kontrolle		Gruppe c: Thyroxin 1:50000000		Gruppe d: Thyroxin 1:100000000	
3748	480	3738	33	3751	147
3749	436	3739	63	3752	132
3750	351	3740	34	3753	186
3759	371	3741	57	3754	208
3760	469	3742	29		
		3743	51		
Gruppe e: Dijodtyrosin 1:50000000		Gruppe f: Dijodtyrosin 1:1000000			
3755	270	3761	263		
3756	261	3762	320		
3757	319	3763	382		
3758	265				

in welcher das Wachstum ebenfalls deutlich, wenn auch schwächer gehemmt ist, ist die Entwicklung unverkennbar weiter vorgeschritten als in Gruppe a (vgl. Abb. 12c). Die Rückbildung der Larvalorgane ist aber geringer als in Gruppe c. Viel schwächer ist die Beeinflussung der Dijodtyrosintiere. Die Durchschnittsgröße ist in beiden Gruppen, was die Längenmaße anbelangt, etwas niedriger. Deutlicher kommt der Größenunterschied in den in Tabelle XIII zusammengestellten Gewichtszahlen zum Ausdruck. Die Larvalorgane sind in beiden Gruppen noch gut erhalten. Auch sonst ist die Entwicklung in Gruppe e und f nicht wesentlich beeinflußt (siehe Abb. 12d).

Von den wenigen noch vorhandenen Tieren brechen in Gruppe a und d am 15. Juni, in Gruppe e am 18. Juni und in Gruppe a und f am 24. Juni bei je einem Tier beide Vorderbeine durch. Der Rest der in Gruppe d, e und f noch lebenden Kaulquappen wird am 24. Juni fixiert (Gruppe d: Nr. 3848 bis 3850; Gruppe e: Nr. 3851 bis 3853; Gruppe f: Nr. 3854 bis 3856).

Ergebnisse des Versuchs 586.

1. *Die viermalige Einwirkung einer Thyroxinlösung von 1 : 50000000 führt bei 1 bis 1½ Monate alten Kaulquappen zu starker Wachstumshemmung und sehr ausgeprägter Entwicklungsbeschleunigung. Das Thyroxin wirkt unter den angegebenen Bedingungen etwas schwächer als eine dreimalige Verfütterung von frischer Rinderschilddrüse.*

2. *Thyroxin vermag selbst in einer Verdünnung von 1 : 100000000 noch die charakteristische Wirkung hervorzurufen, wenn die Einwirkung drei-* bis *viermal wiederholt wird.*

3. *Dijodtyrosin beschleunigt die Entwicklung 1 bis 1½ Monate alter Froschlarven weder in einer Konzentration von 1 : 50000000 noch einer solchen von 1 : 1000000,* auch nicht nach *viermaliger Einwirkung. Das Wachstum erfährt dabei eine geringe Hemmung.*

Versuch 584.

Material: Wie Versuch 573 und 583.

Beginn des Versuchs: 11. Mai 1922. Alter der Tiere: 57 Tage.

Entwicklungsstadium: Große kräftige Tiere mit voll ausgebildeten larvalen Organen. Die Extremitätenanlagen haben eine Länge von 1 bis 3 mm; die Gliederung in ihre einzelnen Abschnitte ist deutlich erkennbar.

Anzahl der Tiere: Fünf Gruppen zu je 12 Tieren.

Versuchsanordnung.

Gruppe a:	Kontrolle. Muskel und Pflanzen.		
„ b:	Dijodtyrosin	. . . . . . 1:	4000
„ c:	„	. . . . . . 1:	20000
„ d:	„	. . . . . . 1:	200000
„ e:	„	. . . . . . 1:	2000000

Das Dijodtyrosin wird unter Zusatz von NaOH klar gelöst und in entsprechender Menge den einzelnen Schalen, die je 1000 ccm Wasser enthalten, beigefügt. Die Einwirkung erfolgt zweimal (das erste Mal für 48 Stunden, das zweite Mal für 24 Stunden). Während der übrigen Zeit werden die Tiere der Gruppe b in gleicher Weise wie in Gruppe a gefüttert.

11. Mai. *Erste Einwirkung* der Lösungen. — 13. Mai. Wasserwechsel. In Gruppe b sind die Schwanzspitzen leicht gekräuselt.

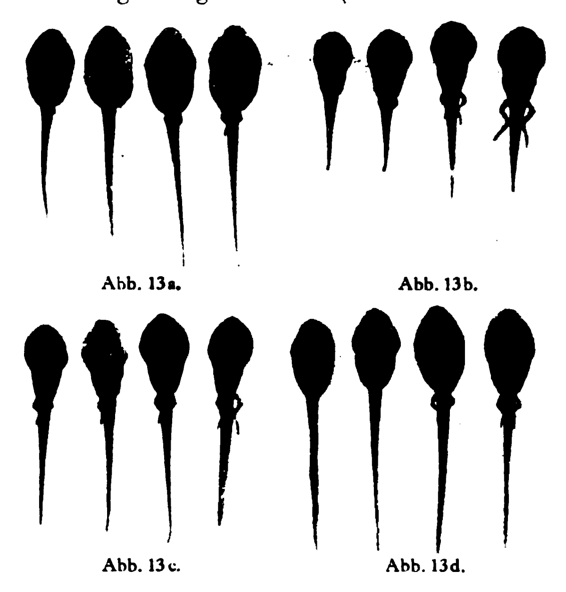


Abb. 13. Versuch 582. 63tägige Kaulquappen (rana temporaria). Versuchsbeginn 11. 5. 1922. Aufgenommen am 17. 5. 1922. Natürliche Größe. — 13a: Gruppe a, Kontrolle. — 13b: Gruppe b, Dijodtyrosin 1:4000 (2×) — 13c: Gruppe c, Dijodtyrosin 1:20000 (2×). — 13d: Gruppe d, Dijodtyrosin 1:200000 (2×).

14. Mai. Die Tiere der Gruppe b erscheinen etwas schmäler als in den übrigen.

15. Mai. *Zweite Einwirkung* der Lösungen. In Gruppe b ist an den Schwanzspitzen deutliche Gewebseinschmelzung festzustellen.

16. Mai. Wasserwechsel. — 17. Mai. Gruppe b: starke Thyreoideasymptome (vgl. Abb. 13b). Der larvale Freßapparat ist völlig rückgebildet, die Hornkiefer abgeworfen, Darm und Ruderschwanz sind stark verkürzt, die linken vorderen Extremitätenanlagen liegen infolge Resorption der Opercularmembran bei einem Teil der Tiere frei. Die Entwicklung der Extremitäten ist sichtlich beschleunigt. Auch in Gruppe c sind die Tiere deutlich beeinflußt (Abb. 13c); die Rückbildungsprozesse sind jedoch schwächer (Lippen verschmälert, Hornkiefer vor dem Abwurf, Rumpf

verschmälert, mäßige Schwanzreduktion, Operculum beiderseits noch erhalten). — In Gruppe d (Abb. 10d) ist nur leichte Beschleunigung in der Entwicklung der Extremitäten festzustellen; die larvalen Organe sind dagegen noch intakt. Die Tiere der Gruppe e zeigen keine nennenswerten Erscheinungen.

18. Mai. Die Tiere der Gruppe b sterben im Laufe des Tages ab. — In Gruppe c haben sich die Schilddrüsenerscheinungen noch verstärkt. — 20. Mai. In Gruppe c sind bei zwei Tieren beide Vorderbeine durchgebrochen, bei fünf weiteren je ein linkes. 22. Mai. Gruppe c: zwei Tiere metamorphosiert. 24. Mai. Gruppe c: Durchbruch beider Vorderbeine bei zwei weiteren Tieren. Bei vier anderen liegt je ein linkes Vorderbein frei. In Gruppe a und d hat sich je ein Tier verwandelt. Weitere Metamorphosen finden statt: in Gruppe a am 27. Mai (3), 30. Mai (2), 6. Juni (1), 8. Juni (1), 9. Juni (1) und 11. Juni (1); in Gruppe c am 27. Mai (1), 28. Mai (1), 6. Juni (2) und 9. Juni (1); in Gruppe d am 27. Mai (1), 28. Mai (2), 30. Mai (1), 3. Juni (3), 10. Juni (1), 11. Juni (1) und 15. Juni (2); in Gruppe e am 27. Mai (1), 28. Mai (1), 30. Mai (1), 3. Juni (3), 6. Juni (2) und 8. Juni (3). Aus dieser Zusammenstellung ist zu entnehmen, daß der Eintritt der Metamorphose in den Gruppen d und e gegenüber der Kontrollgruppe keine nennenswerten Unterschiede aufweist. Auch das Äußere der Tiere weicht vom normalen Aussehen nicht ab.

Ergebnisse des Versuchs 584.

Dijodtyrosin veranlaßt bei 57tägigen Kaulquappen in einer Konzentration von 1 : 4000 nach zweimaliger Einwirkung überstürzte Einschmelzung der Larvalorgane und deutliche Entwicklungsbeschleunigung. In gleicher Weise, aber langsamer und ausgeglichener, wirkt eine Konzentration von 1 : 20000. In einer Verdünnung von 1 : 2000000 ruft Dijodtyrosin unter den vorliegenden Versuchsbedingungen außer einer geringen, kurzdauernden Entwicklungsbeschleunigung keine nennenswerten Veränderungen hervor.

Besprechung der Ergebnisse.

Die vorliegenden Untersuchungen bringen den einwandfreien Beweis, daß das Thyroxin im Kaulquappenversuch die charakteristischen Symptome der Schilddrüsenfütterung hervorzurufen vermag. Die kurzen, über diese Eigenschaft des Thyroxins bisher veröffentlichten Angaben (*Kendall*, *Romeis*, *Swingle*) werden hiermit bestätigt und erweitert. Weiterhin ergibt sich aus den Versuchen, daß das Thyroxin alle Substanzen, mit denen sich bis jetzt im Kaulquappenversuch eine starke spezifische Wirkung erzielen ließ, wie Jodothyrin, Jodthyreoglobulin, Dijodtyrosin, an Intensität der Wirkung ganz erheblich übertrifft. Konzentrationen von 1 : 1000000 bis 1 : 10000000 rufen nach zweimaliger Einwirkung in wenigen Tagen mit völliger Sicherheit die durch Schilddrüsenfütterung zu erzielenden Veränderungen hervor. Der Effekt tritt aber auch noch bei erheblich schwächeren Konzentrationen wie 1 : 50000000 bis 100000000 in einwandfreier Klarheit

zutage, wenn die Einwirkung der Lösung noch ein drittes und viertes Mal erfolgt. Werden die Kaulquappen für die ganze Dauer ihrer Larvalzeit dem Einfluß einer Thyroxinlösung ausgesetzt, so wird ihre Entwicklung selbst noch durch Lösungen von 1 : 5000000000 in deutlich erkennbarer Weise gefördert.

Angesichts dieser Feststellung, daß das Thyroxin selbst in so stark verdünnten Lösungen noch die charakteristischen Erscheinungen hervorzurufen vermag, liegt die Frage nahe, ob nicht in allen Fällen, in welchen die aus der Schilddrüse gewonnenen, charakteristisch wirkenden Präparate bei ihrer chemischen Untersuchung jodfrei zu sein schienen, den betreffenden Substanzen doch noch Spuren von Thyroxin anhafteten, deren Jodgehalt sich aber infolge der minimalen Substanzmengen dem chemischen Nachweis entzog. So berichten *Herzfeld* und *Klinger*[1]) von einem jodfreien Schilddrüsenextrakt, der durch Extraktion frischer Schilddrüsen mit hochprozentigem Alkohol bei alkalischer Reaktion gewonnen wurde und der sich bei Versuchen an kropfigen Ratten als gut wirksam erwies. Bei den Lösungsverhältnissen des Thyroxins ist es sehr leicht möglich, daß dem Extrakt Spuren einer thyroxinhaltigen Substanz beigemengt waren.

Auch ich selbst veröffentlichte Versuche[2]) über eine Substanz, die aus frischen Schilddrüsen durch Extraktion mit Alkohol, Ausfällung mit Phosphorwolframsäure und nochmalige Extraktion mit Alkohol gewonnen wurde und die, soweit die *Baumann-Rabourdin*sche Methode darüber ein Urteil gestattet, jodfrei war. Da sich diese Extraktfraktion sowie eine aus ihrer alkoholischen, mit Schwefelsäure angesäuerten Lösung in sehr geringer Menge auskristallisierende Substanz im Kaulquappenversuch als spezifisch wirksam erwies, so folgerte ich daraus, daß ihre Wirkung nicht von dem Vorhandensein oder dem Fehlen von Jod, sondern vom Aufbau des unter Umständen Jod enthaltenden Gesamtmoleküls bestimmt wird und ferner, daß die vorliegende Substanz sich infolge der Abwesenheit von Jod vom *Kendall*schen Thyroxin unterscheidet. Aus den Versuchsprotokollen jener Arbeit ist nun zu entnehmen, daß die Ausgangsfraktion erheblich schwächer wirkt als die kristallisierende Substanz. Die erstere dürfte demnach ihre Wirksamkeit nur der Beimengung der letzteren verdanken. Im Hinblick auf die starke Wirkung der letzteren besteht aber nach der ganzen Sachlage die Möglichkeit, daß sie einem schwefelsauren Salz des Thyroxins entsprach. Leider war es mir bis jetzt noch nicht möglich, durch erneute Untersuchungen diese Frage klarzustellen.

[1]) *E. Herzfeld* und *R. Klinger*, Chemische Studien zur Physiologie und Pathologie, Zur Funktion der Schilddrüse. Münch. med. Wochenschr. 1918, S. 647—651. — [2]) *B. Romeis*, Versuche zur Isolierung des Schilddrüsenhormones, I. Arch. f. Entw.-Mech. **50**, 410—467, 1922.

Ein weiterer, in der angegebenen Arbeit betonter Befund war, daß die aus der frischen Schilddrüse gewonnene wirksame Extraktfraktion häufig negative *Adamkiewicz-Hopkin*sche Reaktion gab, was auf ein Fehlen des dem Thyroxin zukommenden Tryptophankomplexes hindeutete. Unterdessen konnte ich mich an einem mir nunmehr zur Verfügung stehenden Originalpräparat davon überzeugen, daß die genannte Farbreaktion auch beim Thyroxin selbst negativ ausfällt, so daß ihr also in der vorliegenden Frage keine Bedeutung zukommt. Somit besteht zurzeit die Wahrscheinlichkeit, zum mindesten aber die Möglichkeit, daß die aus der frischen Schilddrüse gewonnenen Substanzen ihre spezifische Wirksamkeit ihrem Gehalt an Thyroxin oder einer dem Thyroxin nahestehenden Verbindung verdanken. Eine andere Frage ist, ob das Hormon in einer der von *Kendall* isolierten Formen in vivo secerniert wird, oder hierbei einem anderen an und für sich indifferenten Körper angelagert ist.

Deutlicher als bei Verfütterung von Schilddrüse, bei welcher graduelle Differenzen im Versuchsergebnis unter Umständen auf Unterschiede in der Freßlust der Tiere oder auf ungleiche Wirksamkeit der verfütterten Drüsen zurückgeführt werden könnten, lassen die Versuche mit den klaren Lösungen des einheitlichen Thyroxins erkennen, daß die Stärke und Art der erzeugten Veränderungen durch die Höhe der verabreichten Einzeldosis, die Zahl der Einwirkungen, das Alter der Tiere sowie ihrer individuellen Empfänglichkeit bestimmt wird. Ähnlich wie bei der Verfütterung frischer oder getrockneter Schilddrüsensubstanz tritt auch beim Thyroxin auf hohe Dosen hin die Dissimilationssteigerung und der damit verbundene Abbau der larvalen Organe in den Vordergrund, während bei niedrigeren Dosen die Entwicklungsbeschleunigung stärker zur Geltung kommt. Es besteht kein zwingender Grund zur Annahme, daß die in Versuchen mit chemisch unreinen Schilddrüsensubstanzen zutage tretenden Differenzen auf einem verschieden hohen Jodgehalt der wirksamen Substanz beruhen. Viel wahrscheinlicher ist es, daß sie durch einen größeren oder geringeren Gehalt an Thyroxin veranlaßt werden. Denn alle bisher durch die Einwirkung von Schilddrüse oder deren Extrakte erzeugten Veränderungen lassen sich bei entsprechender Modifikation der Konzentration und Einwirkungsdauer auch durch Thyroxin hervorrufen. Ausgenommen ist nur die mit Wachstumshemmung verbundene Unterdrückung der Entwicklung, die durch Toluolextrakte veranlaßt wird, aber nicht für Schilddrüse charakteristisch ist[1]).

[1]) Vgl. *B. Romeis*, Experimentelle Untersuchungen über die Wirkung innersekretorischer Organe. V. Teil. Zeitschr. f. d. ges. exper. Med. **6**, 1918 und VI. Teil, Pflügers Arch. **178**, 1919.

Die *physiologische* Wirkung des Thyroxins wird durch das Ergebnis des Versuches 584 beleuchtet, in welchem dasselbe nur in äußerst starker Verdünnung (1 : 5000000000), aber dauernd zur Einwirkung kam, und zwar auf Tiere, die, wie das Verhalten der Kontrolltiere zeigte, zu Neotenie neigten. Unter dem Einfluß des Thyroxins entwickelten sich die Tiere zu sehr kräftigen, wohlproportionierten, lebensfähigen Fröschchen. Es geht daraus hervor, daß das Thyroxin in physiologischer Menge das Wachstum und die Differenzierung des Körpers in förderndem Sinne beeinflußt. Die im Kaulquappenversuch gewöhnlich zutage tretende Wachstumshemmung beruht auf der Verabreichung toxisch wirkender Mengen.

Zu ganz anderen Folgeerscheinungen als die dauernde Einwirkung minimalster Mengen oder die mehrmalige Verabreichung höherer Dosen führt die Einwirkung einer Menge, die einerseits zu niedrig ist, um auf zweimalige Einwirkung hin den charakteristischen Schilddrüseneffekt in seiner vollen Stärke hervorzurufen, andererseits aber doch zu hoch ist, als daß ihre Einwirkung spurlos vorüberginge. Wie Versuch 573 zeigt, kommt es in diesem Falle nur zu den Anfangserscheinungen einer Schilddrüsenwirkung, die in einer mäßigen Wachstums- und Entwicklungsanregung der Extremitätenanlagen bestehen, während die larvalen Organe nicht angegriffen werden. Die Entwicklungsbeschleunigung klingt sehr bald wieder ab, und an ihrer Stelle macht sich ein Stillstand der Differenzierungsprozesse bemerkbar, der infolge der wohlerhaltenen Larvalorgane, äußerlich wenigstens, von Neotenie nicht zu unterscheiden ist.

Die Erklärung dürfte darin zu suchen sein, daß sich die aufgenommene Thyroxinmenge infolge ihrer geringen Menge bald erschöpft, wodurch der direkte Anreiz auf das Gewebe aufhört. Andererseits aber bleibt die Produktion von Schilddrüsenhormon durch die tiereigene Thyreoidea hinter dem Normalmaß der Kontrolltiere zurück, sehr wahrscheinlich infolge des Einflusses der Thyroxinwirkung auf die Hypophyse, durch den wiederum eine Hemmung der Schilddrüsenentwicklung verursacht wird. In gleichem Maße, wie sich diese Schädigung der Drüsen wieder ausgleicht, lenkt auch Wachstum und Entwicklung wieder in normale Bahnen ein. Nach Abschluß der histologischen Untersuchungen werde ich auf diese Frage noch weiter zurückkommen. Von Wichtigkeit ist, daß sich größere Larven, deren Drüsen schon kräftig entwickelt sind, in dieser Weise nicht mehr in ihrer Entwicklung hemmen lassen (Versuch 583).

Da mir Versuche mit Sublimat, über die an anderer Stelle genauer berichtet werden wird, zeigten, daß bei der Einwirkung einer Lösung auf Froschlarven nicht nur deren Verdünnungsgrad, sondern auch die in der Lösung vorhandene absolute Menge an wirksamer Substanz

Tabelle XIV.

Versuch	Gruppe	Substanz	Einzeldosis pro Gruppe g	Zahl der Einwirkungen	Gesamtdosis pro Gruppe g	Zahl der Tiere	Einzeldosis pro Tier g	Gesamtdosis pro Tier g
573	b	Thyroxin	0,0005	2	0,001	20	0,000025	0,00005
	c	"	0,00005	2	0,0001	20	0,0000025	0,000005
	d	"	0,000005	2	0,00001	20	0,00000025	0,0000005
	e	"	0,0000005	2	0,000001	20	0,000000025	0,00000005
573	f	Dijodtyrosin	0,005	2	0,01	20	0,00025	0,0005
	g	"	0,0005	2	0,001	20	0,000025	0,00005
	h	"	0,00005	2	0,0001	20	0,0000025	0,000005
	i	"	0,000005	2	0,00001	20	0,00000025	0,0000005
573	k—n	Jodothyrin	Wie Versuch Nr. 573 f—i					
573	o—r	Jodthyreoglobulin						
583	b	Thyroxin	0,0005	2	0,001	12	0,00004	0,00008
	c	"	0,00005	2	0,0001	12	0,000004	0,000008
	d	"	0,000005	2	0,00001	12	0,0000004	0,0000008
	e	"	0,0000005	2	0,000001	12	0,00000004	0,00000008
583	f	Dijodtyrosin	0,005	2	0,01	12	0,0004	0,0008
	g	"	0,0005	2	0,001	12	0,00004	0,00008
	h	"	0,00005	2	0,0001	12	0,000004	0,000008
	i	"	0,000005	2	0,00001	12	0,0000004	0,0000008
583	k—n	Jodothyrin	Wie Versuch Nr. 583 f—i					
583	o—r	Jodthyreoglobulin						
582	b	Thyroxin	0,0000002	25	0,000005	25	0,000000008	0,0000002
	c	Jodthyreoglobulin	0,0000002	25	0,000005	25	0,000000008	0,0000002
	d	Dijodtyrosin	0,0000002	25	0,000005	25	0,000000008	0,0000002
586	c	Thyroxin	0,00001	4	0,00004	12	0,00000083	0,0000033
	d	"	0,000005	4	0,00002	12	0,00000041	0,0000016
	e	Dijodtyrosin	0,00001	4	0,00004	12	0,00000083	0,0000033
	f	"	0,0005	4	0,002	12	0,000041	0,00016
582	b	Dijodtyrosin	0,25	2	0,5	12	0,02	0,041
	c	"	0,05	2	0,1	12	0,0041	0,0083
	d		0,005	2	0,01	12	0,00041	0,00083
	[illegible]	[illegible]	0,0005	2	0,001	12	0,000041	0,000083

von Bedeutung ist, wurden für die nachfolgende Zusammenstellung die in den einzelnen Versuchen zur Einwirkung gelangten Gesamtmengen berechnet. Unter Berücksichtigung der Zahl der Tiere eines Versuches läßt sich dann auch die ungefähre Minimaldosis ermitteln, die zur Erreichung eines typischen Schilddrüseneffektes notwendig ist. Aus Tabelle XIV und den Versuchsprotokollen ist zu entnehmen, daß 0,0000025 g bei zweimaliger Einwirkung (= 0,000005 g) noch die typische Wirkung hervorrufen, während 2 × 0,00000025 g dazu nicht mehr ausreichen. Bei viermaliger Einwirkung genügen dagegen schon 0,0000004 g = 0,0000016 g. Physiologische Reizwirkung läßt sich bei dauernder Einwirkung aber noch mit einer Gesamtmenge von 0,000000008 g erzielen.

Daß sich die Wirkung der Schilddrüsenfütterung auch mit Dijodtyrosin erzielen läßt, ist seit den Untersuchungen von *Morse*[1]), *Romeis*[2]), *Abelin*[3]), *Abderhalden* und *Schiffmann*[4]) u. a. bekannt. Die vorliegenden Untersuchungen zeigen aber, daß es dazu viel höherer Dosen bedarf als beim Thyroxin. Eine zweimalige Einzeldosis von 0,004 g Dijodtyrosin entspricht in ihrer Wirkung etwa einer zweimaligen Einzeldosis von 0,000004 g Thyroxin. Ähnlich wie beim Thyroxin kann aber auch beim Dijodtyrosin durch die mehrmalige Einwirkung sehr kleiner Mengen Wachstumshemmung und Entwicklungsverzögerung hervorgerufen werden. Eine Unstimmigkeit in den Ergebnissen besteht hinsichtlich des Versuches 573, in welchem das Dijodtyrosin schon bei Einzeldosen von 0,00025 g die charakteristischen Veränderungen veranlaßte. Die Ursache dieses abweichenden Verhaltens ist mir zurzeit noch unbekannt. Es ist möglich, daß es darin begründet ist, daß die Einwirkung in Versuch 573 auf einem frühzeitigeren Entwicklungsstadium erfolgte als in den anderen Versuchen.

---

[1]) *M. Morse*, Journ. of biol. Chem. **19**, 1915.

[2]) *B. Romeis*, Zeitschr. f. d. ges. exper. Med. **6**, 1918; Arch. f. Entw. Mech. **50**, 1922.

[3]) *J. Abelin*, diese Zeitschr. **116**, 138, 1921.

[4]) *Abderhalden* und *Schiffmann*, Pflüg. Arch. **194**, 206, 1922.

Über das Schicksal von Natriumthiosulfat im Organismus.

Von

Wilhelm Nyiri.

(Aus der II. medizinischen Abteilung des Krankenhauses Wieden in Wien.)

(Eingegangen am 10. Juli 1923.)

Unter den elementaren chemischen Stoffen fällt dem Schwefel im tierischen Organismus keine unbedeutende Rolle zu; dies erkennen wir schon daraus, daß im Körper sowohl organische, wie anorganische schwefelhaltige Produkte mehrfach vorkommen. Vor allem der Umstand, daß das Körpereiweiß und gewisse Abbauprodukte desselben Schwefel enthalten, spricht für die Bedeutung dieses Elementes im Organismus. Dementsprechend befassen sich auch zahlreiche Arbeiten in der Literatur mit dem Schwefelstoffwechsel. Erst in letzter Zeit hat z. B. *Hottinger*[1]) nachgewiesen, daß der Schwefel im Organismus sowohl als Reduktionsmittel, wie auch als Oxydationsmittel wirken kann. Trotzdem aber sind wir noch weit davon entfernt, ein klares Urteil über das Schicksal vieler schwefelhaltiger Produkte im Körper zu bekommen. Es hat demnach jede Beobachtung, die zur Klärung dieser komplizierten biologischen Verhältnisse, wenn auch nur in bescheidenem Ausmaße, beiträgt, eine Berechtigung.

Seitdem wir zur Feststellung der Nierenfunktion Natriumthiosulfat dem Organismus[2]) einverleiben, haben wir dem Schwefelstoffwechsel neuerdings eine größere Aufmerksamkeit zugewendet. Wenn wir nämlich dem Körper intravenös 1 g $Na_2S_2O_3$ zuführen, so treten bei erhaltener Nierenfunktion etwa 30 bis 40 Proz. dieses Salzes in den Harn über, wogegen bei gestörter Leistungsfähigkeit der Nieren dem

[1]) *Hottinger*, Schweiz. med. Wochenschr. 1923, Nr. 17.

[2]) *W. Nyiri*, Wien. klin. Wochenschr. 1922, Nr. 26; Klin. Wochenschr. 1923, Nr. 5; Die Thiosulfatprobe (Monographie). Wien-Leipzig, Deuticke, 1923.

Grade der Schädigung entsprechend nur geringere Mengen im Harn zu finden sind. Es erscheinen demnach in unzersetztem Zustande im besten Falle 40 Proz. der einverleibten Menge Thiosulfat im Urin. Unwillkürlich hat sich uns daher die Frage aufgedrängt, was mit den restlichen 60 und mehr Prozenten im Körper geschieht.

Das Natriumthiosulfat ist bekanntlich oxydativen Vorgängen leicht zugänglich. Durch viele chemische Stoffe wird eine Zersetzung dieses Salzes in SO_2 und S hervorgerufen. Durch Oxydation dieser Körper wieder entsteht in letzter Linie Schwefelsäure, bzw. ihr Salz. Die Annahme lag daher von vornherein nahe, daß aus Natriumthiosulfat im Körper wenigstens zum Teil Natriumsulfat würde.

Mit dieser Frage befaßte sich denn auch *Trachtenberg*[1]) im Jahre 1861. In seiner Arbeit „Zur Frage über die Neutralisation überschüssiger Alkalien im Blute" verwendet er zwecks Absättigung von basischen Stoffen im Blute unter anderem das $Na_2S_2O_3$ und prüft bei dieser Gelegenheit den Harn, ob nach peroraler Verabreichung von $Na_2S_2O_3$ die ausgeschiedene Schwefelsäuremenge zunehme. Zur quantitativen Bestimmung der H_2SO_4 im Harn benutzt er die übliche gravimetrische Methode der Barytfällung. Tatsächlich findet er nach Einnahme von wenigstens einigen Grammen Natriumthiosulfat regelmäßig eine Vermehrung des Schwefelsäuregehalts im Harn. Doch begnügt sich *Trachtenberg* mit der Feststellung, daß der Überschuß an Schwefelsäure bei Einnahme von kleineren Dosen des Salzes relativ größer ist, als bei Einnahme von größeren Dosen, daß aber absolut die Vermehrung der Schwefelsäure bei großen Dosen des Mittels steigt, ohne auf nähere quantitative Beziehungen zwischen der Menge des dem Körper einverleibten Schwefels und der des im Harn erscheinenden Schwefels einzugehen.

Durch Ausarbeitung der Thiosulfatprobe war es uns interessant, einerseits die Angaben *Trachtenbergs* nachzuprüfen, andererseits nachzusehen, ob nach Ausscheidung von unzersetztem Thiosulfat die ganze restliche Menge dieses Salzes oder nur ein Teil desselben im Körper zu schwefelsaurem Natrium verbrannt wird. Es erschien uns wertvoll, als Ergänzung unserer Mitteilungen über die Thiosulfatprobe auch über das Schicksal des im Körper eine Veränderung erfahrenden Anteils von $Na_2S_2O_3$ etwas Bestimmtes aussagen zu können und für unsere Behauptungen zahlenmäßige Belege zu erbringen.

Um eine eventuelle Vermehrung der Schwefelsäureausscheidung im Harn nach Thiosulfatverabreichung feststellen zu können, mußten wir zunächst eine annähernd gleichbleibende tägliche SO_3-Ausscheidung im Harn erreichen. Wir verabreichten daher täglich eine annähernd gleiche Kost und bestimmten im 24stündigen Harn die Schwefelsäureausscheidung gravimetrisch. Als wir bei einem Patienten ein solches tägliches Gleichgewicht erzielt hatten, bestimmten wir weiterhin, ob sich in zweistündlichen Harnmengen (von 6 Uhr früh bis 12 Uhr mittags) annähernd gleiche SO_3-

[1]) *Trachtenberg*, Inauguraldissertation, Dorpat 1861.

Werte vorfanden. Da bei einer Belastung des Organismus mit 1 g $Na_2S_2O_3$ im besten Falle eine Vermehrung von auch etwa nur 1 g Schwefelsäure zu gewärtigen war, so konnte man, wenn überhaupt, diesen relativ geringen Überschuß am ehesten in einer Zweistundenportion des Harns erwarten. Eine annähernd quantitative Übereinstimmung der zweistündigen SO_3-Ausscheidungen ließ sich leicht feststellen. Darauf erhielt der Patient einmal 1 g $Na_2S_2O_3$ per os und an einem anderen Tage dieselbe Menge intravenös. Es zeigte sich jedoch kein merklicher Unterschied in den ausgeschiedenen Mengen SO_3, trotzdem beim peroralen Versuch keine Spur von unzersetztem Thiosulfat im Harn zu finden war, während nach intravenöser Verabreichung 34,9 Proz. unveränderten Salzes mit Hilfe der Jodometrie im Urin nachgewiesen werden konnten. Die nebenstehenden zwei kleinen Tabellen geben die Versuche wieder und enthalten die näheren Details (Tabelle I und II):

Tabelle I.

8h früh 1,0 $Na_2S_2O_3$ *per os* mit 200,0 H_2O.

Stunde	Harnmenge	SO_3 g
6— 8h	225	0,5653
8—10	230	0,5954
10—12	194	0,6503
12— 2	150	0,6750

Tabelle II.

8h früh 1,0 $Na_2S_2O_3$, 10proz. *intravenös.*

Stunde	Harnmenge	SO_3 g
6— 8h	86	0,6815
8—10	162	0,6706
10—12	152	0,7007
11— 2	194	0,7025

Aus den Tabellen geht deutlich hervor, daß die zweistündlichen SO_3-Werte im Harn vor der Verabreichung von $Na_2S_2O_3$ und in den folgenden Stunden etwa gleich hoch gefunden wurden. Dieser Umstand darf uns jedoch nicht verwundern, da 1 g SO_3 und weniger doch vielleicht eine zu geringe Menge vorstellt, um als Überschuß über einen schon normalerweise ziemlich beträchtlichen Schwefelsäurestoffwechsel bemerkbar zu werden.

Dementsprechend habe ich den nächsten Versuch mit einer größeren Menge $Na_2S_2O_3$ wiederholen müssen.

Freilich konnte dies nur bei peroraler Applikationsweise geschehen, da wir dem Körper intravenös nicht allzu viel Salz zuführen wollten. *Trachtenberg* gab in seiner vorhin erwähnten Arbeit an, daß nach Einnahme von 18 g und mehr Natriumthiosulfat mehrere flüssige Stühle auftraten, in denen offenbar ein nicht bestimmbarer Teil des dem Körper einverleibten $Na_2S_2O_3$ dem Stoffwechsel entging. Um dies zu vermeiden, nahm ich daher 10 g des Salzes ein. Vorher stellte ich die Gesamtausscheidungen von Schwefelsäure in den 24stündigen Harnmengen fest und bestimmte getrennt die Sulfatschwefelsäure und die Ätherschwefelsäure:

Wie aus Tabelle III ersichtlich, fingen wir am Tage der $Na_2S_2O_3$-Belastung den Harn in drei getrennten Portionen auf und am folgenden Tage in zwei Portionen; sonst wurde stets die gesamte 24stündige Menge als einzige Portion untersucht. Trotzdem ich nur 10 g $Na_2S_2O_3$

um 8 Uhr früh eingenommen hatte, traten am Nachmittage gegen 4 Uhr zweimal leichte Diarrhöen auf, die, wie auch *Trachtenberg* schon seinerzeit an sich feststellen konnte, vollkommen ohne Tenesmen und ohne Kolikschmerzen verliefen. Ein wenn auch kleiner Teil des $Na_2S_2O_3$

Tabelle III.

Schwefelsäurebestimmungen im Harn.

Datum	Stunde	Harnmenge	Sulfatschwefelsäure SO_3 g	Ätherschwefelsäure SO_3 g	Bemerkungen
13. III.		1100	1,9658	0,0475	
14. III.		960	2,1699	0,1099	
15. III.		960	2,7382	0,1159	
16. III.	8—2h	214	2,0702 }	0,0238	8h früh 10,0 g $Na_2S_2O_3$ *per os* mit 200,0 g H_2O 4h nachm. zwei dünnbreiige Stuhlentleerungen
	2—8	592	3,5609 }	0,0609	
	8—8 früh	360	3,0194 }	0,0927	
17. III.	8—2h	204	0,9679 }	0,0133	
	2—8 früh	530	2,7670 }	0,0326	
18. III.		670	2,6192	0,0158	
19. III.		755	1,9100	0,0439	
20. III.		1030	2,1352	0,0274	
21. III.		680	1,9981	0,0127	

war demnach vermutlich in unzersetztem Zustande dem Organismus entwichen. Nichtsdestoweniger ist das Versuchsresultat ein durchaus zufriedenstellendes.

Die Tabelle zeigt, daß in den ersten 24 Stunden nach der Einnahme von $Na_2S_2O_3$ 8,6 g Sulfatschwefelsäure im Harn gefunden wurden, während in den folgenden 24 Stunden nur mehr 3,7 g auftraten. Sämtliche diesbezüglichen Werte der übrigen Tage sowohl vor, wie nach dem eigentlichen Versuche haben annähernd korrespondierende Zahlengrößen, deren Mittelwert etwa 2,1 g ausmacht. Rechnen wir für die beiden Tage, an denen die Schwefelsäure im Harn vermehrt war, die durchschnittliche Menge der SO_3-Ausscheidung ohne Salzbelastung auch mit etwa 2,1 g, so bekämen wir am ersten Tage ein Plus von etwa 6,5 g SO_3, und am zweiten Tage ein solches von etwa 1,6 g SO_3. Die gesamte Mehrausscheidung an Sulfatschwefelsäure beläuft sich demnach auf etwa 8,1 g.

Berechnen wir theoretisch, wieviel Gramm SO_3 bei vollständiger Oxydation aus 10 g $Na_2S_2O_3$ (reiner Substanz) entstehen können, so resultiert der Wert von 10,125 g SO_3. Praktisch können wir daher aus 10 g $Na_2S_2O_3$ auch wieder 10 g SO_3 erhalten. Aus dieser Überlegung geht hervor, daß wir in unserem Versuche **80 Proz.** des dem Körper einverleibten Salzes *als Sulfatschwefelsäure wiedergefunden* haben.

Dazu kommt noch, daß, wie folgende kleine Tabelle (IV) zeigt, ein wenn auch kleiner Teil von $Na_2S_2O_3$ in unzersetztem Zustande in den Harn übertrat und in diesem jodometrisch bestimmt werden konnte. Die ausgeschiedene Menge Thiosulfat beträgt 548 mg, d. h. 5,48 Proz. Addieren wir diese 5 Proz. $Na_2S_2O_3$ zu dem früher gefundenen Werte von Sulfatschwefelsäure — ein Vorgang, den wir nach dem früher

Tabelle IV.

16. März, 8^h früh, 10,0 $Na_2S_2O_3$ *per os* mit 200,0 H_2O.

Stunde	Harnmenge	Auf 10 ccm Harnmenge verbrauchte Jodlösung ccm	Ausscheidung von $Na_2S_2O_3$ mg	Ausscheidung von $Na_2S_2O_3$ Proz.
8^h	80	0,1	—	—
8 bis 2^h	214	1,0	304	3,04
2 bis 9^h abends	592	0,3	187	1,87
9^h abends bis 8^h früh	360	0,2	57	0,57
8^h früh bis 2^h nachm.	204	0,07	—	—
		Gesamtausscheidung . .		5,48 Proz.

Gesagten ohne groben Fehler tun können —, so haben wir insgesamt etwa 86 Proz. des peroral einverleibten Schwefels im Harn wiedergefunden. Wir gehen wohl kaum fehl, wenn wir annehmen, daß die übrigen 14 Proz., das ist 140 mg $Na_2S_2O_3$, mit den diarrhoischen Stühlen den Körper wieder verlassen haben, und glauben uns doch vielleicht mit aller Reserve zu dem Schluß berechtigt, daß die Oxydation des Thiosulfats im Körper mit Ausnahme des durch die Nieren hindurchtretenden Anteils eine vollständige ist und bis zur höchsten Oxydationsstufe, das ist dem Natriumsulfat, geht.

Betrachten wir im Gegensatz zu den Werten der Sulfatschwefelsäure die Ätherschwefelsäuren, so sehen wir, daß hier kaum eine nennenswerte Vermehrung im Harn nachzuweisen ist.

Ein zweiter Versuch, den wir zwecks vollständiger Verhütung der Diarrhöen mit nur 5 g $Na_2S_2O_3$ (peroral) anstellten, ergab leider kein so exaktes Resultat, indem einerseits trotz der geringeren Menge leichtes Abführen auftrat, andererseits das Plus an Schwefelsäure nicht so schlagend zutage trat, wie bei Verwendung der größeren Menge $Na_2S_2O_3$. Dieser Versuch förderte 287 mg unzersetztes $Na_2S_2O_3$ zutage, demnach 5,7 Proz. der eingeführten Menge. Aus dem Vergleich der beiden Thiosulfatbestimmungen erkennen wir, daß bei peroraler Verabreichung von 5 g und 10 g $Na_2S_2O_3$ in beiden Fällen etwa 5,5 Proz. des Salzes in unveränderter Form in den Harn übertritt. Dagegen finden wir nach Einnahme von nur 1 g dieses Salzes bei wiederholten Versuchen niemals meßbare Mengen Thiosulfat im Harn, so daß die Oxydation im Körper bei peroraler Applikation derart geringer Mengen eine vollkommene ist.

Darüber, wo im Körper diese Oxydation des $Na_2S_2O_3$ vor sich geht, läßt sich zurzeit leider nichts Bestimmtes aussagen. Wie wir bereits in unserer Monographie (Die Thiosulfatprobe, Wien-Leipzig, Deuticke, 1923) erwähnt haben, ergaben Versuche, die wir zur Klärung dieser Frage unternommen hatten, ein negatives Resultat. Am wahrscheinlichsten erscheint noch die Annahme, daß die oxydierende Einwirkung auf das $Na_2S_2O_3$ mehr oder weniger allen Zellen und Gewebssäften des lebenden Körpers zukommt und wohl auch vom zirkulierenden Blute aus erfolgt.

Zusammenfassung.

Die vorliegenden Versuche befassen sich mit der Frage, wieweit die Oxydation des Natriumthiosulfats im Körper vor sich geht. Das Resultat gestattet den Schluß, daß die gesamte Menge des $Na_2S_2O_3$, die nicht die Nieren unverändert passiert, im Körper verbrannt wird. Als Endprodukt dieser Oxydation tritt eine Vermehrung der Sulfatschwefelsäure im Harn auf.

Der Fettstoffwechsel bei der Avitaminose.

I. Mitteilung:

Der Gesamtfettgehalt und Cholesteringehalt des Körpers bei normaler und avitaminöser Ernährung.

Von

Kazuo Asada (Kioto, Japan).

(Aus der experimentell-biologischen Abteilung des pathologischen Instituts der Universität Berlin.)

(Eingegangen am 12. Juli 1923.)

Um einen tieferen Einblick in das Wesen der avitaminösen Stoffwechselstörung zu gewinnen, ist es erforderlich, daß man den Stoffwechsel der organischen und denjenigen der anorganischen Substanz nach allen Richtungen hin untersucht. Über den Umsatz der organischen Materie im avitaminösen Körper liegt bereits eine Reihe von Erfahrungen vor, und es waren nicht zuletzt die Arbeiten aus dem hiesigen Laboratorium, die hier eine Vertiefung unserer Kenntnisse gebracht haben.

Bisher ist allerdings fast nur der Stickstoff- und Kohlehydratstoffwechsel Gegenstand der Untersuchung gewesen. Über den Fettstoffwechsel bei der Avitaminose, soweit er nicht im Gaswechsel seinen Ausdruck findet, ist, abgesehen von der Beobachtung, daß die avitaminös gefütterten Tiere oft in einem Zustande hochgradiger Abmagerung mit makroskopisch sichtbarem Fettmangel sterben, so gut wie nichts bekannt. Aus diesem Grunde habe ich auf den Vorschlag von Herrn Prof. Dr. *Bickel*, der diese Fragen zurzeit in seinem Laboratorium eingehender bearbeiten läßt, zunächst den Gesamtfett- und Cholesteringehalt des Körpers avitaminöser Ratten genauer studiert. Auf einzelne Angaben in der Literatur, die hierzu in Beziehung stehen, komme ich später noch zu sprechen.

Es läßt sich nun aus begreiflichen Gründen der Fettstoffwechsel nicht so untersuchen, wie man z. B. den Stickstoffwechsel untersucht, indem man Eingabe und Ausgabe der Fettsubstanz ermittelt. Die Verhältnisse liegen komplizierter. Erstens wird im Körper Fett aus Kohlehydrat gebildet, das Körperfett stammt also nur teilweise aus dem Nahrungsfett; da die Fettbildung aus Eiweiß wohl über das Kohlehydrat geht, kann sie hier unberücksichtigt bleiben. Zweitens ist das Schicksal des in den Körper eingeführten oder in ihm aus den Kohlehydraten gebildeten Fettes ein doppeltes: es wird entweder verbrannt und sein Endprodukt tritt dann im Gaswechsel in die Erscheinung, oder es wird im Körper teils dem Protoplasma an- und eingefügt, oder

als richtiges Fettdepot abgelagert. Nun kann aber der Körper aus seinem Bestande auch wieder Fett abgeben, das soll heißen, entweder kann das im Protoplasma verankerte Fett gewissermaßen in Freiheit gesetzt werden — ich denke hier an gewisse Formen der fettigen Degeneration —, oder es können vorhandene Fettdepots eingeschmolzen werden. Durch diese beiden Vorgänge wird der Fettstoffwechsel nun noch mehr kompliziert. Wenn wir den Weg verfolgen, den das Fett im Körper nimmt, so kommen wir zu folgenden Vorstellungen:

Das mit der Nahrung eingeführte Fett gelangt schließlich in die Blutbahn, wird von den Zellen des Blutes und den übrigen Körperzellen aufgenommen und in den Zellen weiter verarbeitet oder als Fett in ihnen deponiert. Die Fettbildung aus Kohlehydrat findet in Zellen statt, in denen das Fett entweder liegen bleiben kann oder über den Blutweg zu anderen Zellen gelangt. Dann verhält es sich also hinsichtlich des Transportweges genau wie das mit der Nahrung eingeführte Fett.

Das aus den Fettdepots im engeren Sinne frei werdende Fett, das natürlich nicht nur aus dem Fett, sondern auch aus den Kohlehydraten der Nahrung stammt, muß ebenfalls in die Blutbahn gelangen; denn sonst wäre eine Fettwanderung, wie wir sie z. B. bei der Phosphorvergiftung sehen, nicht möglich.

Bei der sogenannten fettigen Degeneration einzelner Organe, bei der es sich in gewissen Fällen doch wohl um eine Art Dissoziierung, um ein Sichtbarwerden des an das Protoplasma gebundenen Fettes handelt, könnte dieses Fett ebenfalls an das Blut abgegeben und vielleicht an anderem Orte verbrannt oder in seinen einzelnen Komponenten ausgeschieden werden.

Aus alledem geht jedenfalls so viel hervor, daß das Blut Fett zum Transport aus verschiedenen Quellen erhalten kann: vom Darmkanal, aus Körperzellen und besonders aus den Fettdepots und unter bestimmten Bedingungen aus degenerierenden Zellen. Es muß nun der Fettgehalt des Blutes ganz allgemein abhängen von der Größe der Fettzufuhr zum Blute und der Größe der Fettabgabe an die Zellen, oder, besser ausgedrückt, der Fettaufnahme durch die Zellen. Ganz entsprechend verhält sich bekanntlich auch der Blutzuckergehalt (*Arnoldi*).

Im Hinblick auf die Verhältnisse bei der Avitaminose sind folgende Fälle genauer zu betrachten:

a) Die Fettzufuhr vom Darmkanal kann normal, aber die Fettaufnahme durch die Zellen herabgesetzt sein. Dann muß als Folge eine Steigerung des Blutfettgehaltes auftreten.

b) Die normale Fettzufuhr vom Darmkanal verbindet sich mit einer Fettzufuhr aus den Fettdepots; wiederum müßte das Blutfett vermehrt sein, und es wäre erst recht vermehrt, wenn dazu eine Herabsetzung der Fettaufnahme durch die Körperzellen träte.

c) Die normale Fettzufuhr vom Darmkanal fällt zusammen mit einer Abgabe von Fett aus den Fettdepots oder mit einer Abgabe von Fett aus den Zellen bei der Dissoziation des Protoplasmas im Stadium der Degeneration, wieder müßte das Blutfett vermehrt sein und erst recht, wenn die Fettaufnahme durch die Körperzellen dazu noch gestört wäre.

d) Wenn aber das Blut als Fettquelle nur noch das Nahrungsfett und keine Fettdepots mehr hat, weil letztere aufgebraucht sind, und wenn bei der fettigen Dissoziation des Protoplasmas keine erheblichen Fettmengen an das Blut abgegeben würden, wenn aber andererseits die Aufnahmefähigkeit der Körperzellen für Fett herabgesetzt wäre, dann müßte das Blutfett zwar auch noch vermehrt sein, aber seine Vermehrung müßte weniger hochgradig sein als in dem Falle, in dem außerdem noch Fett aus den Fettdepots des Körpers ihm zufließen kann.

In mehreren Arbeiten aus dem hiesigen Laboratorium, von *Collazo* und *Gomez Bosch*[1]), *Alpern* und *Collazo*[2]), *Schazillo*[3]), ist gezeigt worden, daß in der Tat bei der Avitaminose, wie auch *Ogata*[4]) fand, der Fettgehalt des Blutes beträchtlich erhöht ist, daß aber in den letzten Stadien der Krankheit der Fettgehalt wieder etwas sinkt, ohne jedoch den Normalwert oder gar subnormale Werte wie beim Hungerzustande zu erreichen. Auch meine Beobachtungen über den Blutfettgehalt, über die ich in einer späteren Arbeit berichten werde, besagen dasselbe. Man kann also den Satz aufstellen, daß *bei der Avitaminose der Blutfettgehalt abnorm gesteigert* ist.

Die Ursache für dieses Phänomen wird wohl ein vermehrter Zufluß von Fett zum Blute und eine Verminderung der Stapelfähigkeit für Fett von seiten des Organismus sein. Das Fett stammt aus der Nahrung, aus den Fettdepots und vielleicht auch aus fettig degenerierendem Gewebe. Der vitaminhaltige Körper hat unter analogen Umständen einen geringeren Blutfettgehalt.

In meinen bisherigen Ausführungen war immer von dem Fett schlechthin die Rede. Die Fettsubstanz des Körpers setzt sich aber aus mehreren Komponenten zusammen. Wir analysieren in der verseiften Substanz einmal den Petrolätherextrakt (gleich Gesamtfett); ferner den Petrolätherextrakt minus Cholesterin (gleich hochmolekulare Fettsäuren) und stellen die hochmolekularen Fettsäuren nach der Multiplikation mit dem Faktor 1,046 als *Neutralfett* in die Rechnung ein. Hier soll zunächst nur von dem Gesamtfett bzw. dem Neutralfett

---

[1]) *Collazo* und *G. Bosch*, erscheint in dieser Zeitschr. 1923.

[2]) *Alpern* und *Collazo*, Zeitschr. f. d. ges. exper. Med. **35**, 288, 1923.

[3]) *Schazillo*, nach dem Manuskript zitiert.

[4]) *T. Ogata*, Japan. Zeitschr. f. Path., X. Jahrg., 1920.

die Rede sein, die immer parallel gehen, und in meinen vorstehenden Ausführungen hatte ich auch nur diese Substanzen im Sinne, als ich von Fett schlechthin sprach.

Die erste Frage, die wir uns bei dem Problem des Fettstoffwechsels bei der Avitaminose vorlegen müssen, ist die, wieviel Gesamt- und Neutralfett ein mit gemischter Kost (Eiweiß, Fett, Kohlehydrat) vitaminfrei ernährtes Tier im Vergleich zu einem gleich lange und mit gleicher, aber vitaminhaltiger Kost ernährten Tiere besitzt. Meine nachstehend beschriebenen Versuche lehren, daß der Totalfettgehalt des avitaminösen Tieres unter diesen Bedingungen um etwa 4 Proz. geringer ist als der Totalfettgehalt des Normaltieres. *Daraus ergibt sich, daß bei gemischter Kost der avitaminöse Körper in toto eine Fettverarmung erkennen läßt, wohlgemerkt bei Fettvermehrung im Blute.*

Die zweite Frage lautet folgendermaßen: „Wie verhält sich bei einseitiger Ernährung (überwiegender Gehalt der Nahrung an Fett oder Kohlehydrat bei einem vorhandenen Eiweißminimum oder bei reiner Eiweißkost) der Totalfettgehalt des avitaminös ernährten Körpers gegenüber dem Totalfettgehalt eines mit dem gleichen, nur vitaminhaltigen Futter ernährten Körpers?" Darauf geben meine Versuche folgende Antwort: Die vornehmlich mit Fett ernährten Normaltiere haben mehr Fett als die vornehmlich mit Kohlehydrat ernährten Normaltiere. Die vornehmlich mit Kohlehydrat ernährten avitaminösen Tiere haben mehr Fett als die vornehmlich mit Fett ernährten avitaminösen Tiere. Aber es haben die avitaminösen Kohlehydrattiere und erst recht die avitaminösen Fettiere sehr viel weniger Körperfett als die entsprechenden Normaltiere. Reine Eiweißkost macht die Normaltiere äußerst fettarm, die avitaminösen Tiere aber noch fettärmer.

Was lehren uns nun diese Versuche über den Fettstoffwechsel bei der Avitaminose? Der avitaminöse Körper verarmt an Fett. Am besten steht sich der avitaminöse Körper hinsichtlich der Aufrechterhaltung seines Fettbestandes bei einer gemischten Nahrung im Gegensatz zu dem Normalkörper, der bei einer vornehmlich aus Fett und Kohlehydrat bestehenden Nahrung besonders fettreich wird. Der avitaminöse Körper scheint danach durch eine einseitige Ernährung im Gegensatz zu dem Normalkörper besonders gefährdet zu sein und bei ihr, obschon sie eine reiche Quelle für den Fettansatz sein könnte, doch nicht in der Lage zu sein, diese Quelle genügend auszunutzen.

Wenn man diese Beobachtungen nun mit den eingangs erwähnten Blutbefunden bei der Avitaminose in Verbindung bringt, dann ersieht man daraus, daß trotz des gesteigerten Blutfettgehaltes der Fettgehalt des gesamten Körpers vermindert ist, daß also *im avitaminösen Körper lediglich mehr zirkulierendes Fett* vorhanden ist. Der avitaminöse

Körper *schmilzt seine Fettdepots ein*, seine Zellen nehmen das Nahrungsfett nicht mehr im normalen Tempo zur Ablagerung auf. Es wird aber, wegen der Abnahme des Totalfettgehaltes des Körpers schließlich das Nahrungsfett, und obendrein auch noch das Fett aus den Depots, trotz alledem zerstört und bei der avitaminösen Zelldegeneration dazu noch Fett aus dem Protoplasma in Freiheit gesetzt. Aus alledem kann man schließen, daß *bei der Avitaminose* die Abgabe des Fettes aus den Fettlagern, der Fetttransport in der Richtung zum Blute erhöht ist, und daß gleichzeitig die Körperzellen nicht in entsprechend erhöhtem Grade Fett aufnehmen. Die Folge ist eine Fettstauung im Blute bzw. eine Vermehrung des Blutfettgehaltes. Da aber schließlich doch mehr Fett umgesetzt wird als beim Normaltiere, resultiert letzten Endes eine Fettverarmung des gesamten Organismus.

Im Sinne einer Fettstauung im Blute sprechen auch die alimentären Lipämieversuche bei Avitaminose von *Collazo* und *Bosch* (l. c.).

In einer engen Beziehung zum Fettstoffwechsel steht nun der Gaswechsel. Es ist über allen Zweifel sichergestellt, daß der avitaminöse Körper im nüchternen Zustande einen herabgesetzten Sauerstoffverbrauch aufweist. Diese Tatsache aber steht insofern nicht im Einklang mit den Ergebnissen meiner Versuche, weil ein gesteigerter Fettumsatz eigentlich zu einem gesteigerten Sauerstoffverbrauch führen müßte.

Nun sind zwei Möglichkeiten für die Erklärung dieses Widerspruchs vorhanden. Es könnte einmal der avitaminöse Körper nur zur Zeit der Nahrungsaufnahme eine gesteigerte Oxydation zeigen, und zwar müßte diese dann pathologisch gesteigert sein; es müßte sich gewissermaßen um einen explosionsartigen Verbrennungsvorgang handeln; oder aber es könnte das Fett im avitaminösen Körper derart zerstört werden, daß harnfähige Kohlenstoffverbindungen entstehen. Dann aber müßte der Kohlenstoff des Harns vermehrt sein. Auch andere Möglichkeiten liegen noch vor. Das sind alles Fragen, die einer weiteren Klärung bedürfen.

Ich habe zunächst hier einen allgemeinen Umriß für die Störung, die der Fettstoffwechsel bei der Avitaminose zeigt, gegeben. Wir müssen nun noch etwas genauer betrachten, wie sich der Fettstoffwechsel in den Fällen verhält, in denen dem Körper entweder nur Eiweiß oder bei einem Eiweißminimum nur Fett oder nur Kohlehydrat gegeben wird.

Bei reiner Eiweißnahrung erhält der Körper mit der Nahrung praktisch überhaupt kein Fett. Eiweiß als Fettquelle spielt also hier kaum eine Rolle. So schwindet denn schon im vitaminhaltig ernährten (gleich normalen) Körper das Fett, indem es bis auf kleine Reste, zum Teil nach seiner Mobilisation aus den Depots verbrannt wird. Beim

avitaminösen Körper aber schwindet noch mehr Fett dahin als beim normalen Körper. Der Grund für diesen gesteigerten Fettschwund kann nur in einer für den avitaminösen Körper spezifischen Steigerung der Fettbewegung und damit auch der Fettzerstörung liegen.

Bei reiner Fettnahrung neben einem Eiweißminimum setzt der normale Körper große Mengen Fett an, aber der avitaminöse wird unter diesen Umständen so fettarm wie bei reiner Eiweißnahrung. Der Grund hierfür muß erstens darin liegen, daß Fett nicht deponiert werden kann, und zweitens darin, daß das von den Zellen aufgenommene Fett sofort weiter umgesetzt wird. Da nun trotz der großen Fettzufuhr obendrein auch noch die ursprünglich vorhandenen Fettdepots einschmelzen, obschon man annehmen kann, daß durch das Nahrungsfett der Kalorienbedarf reichlich gedeckt wäre, wie es ja auch bei dem Normaltiere, das dabei sehr fettreich wird, der Fall ist, so muß der Grund für diese Einschmelzung der Depots bei den avitaminösen Tieren in einer mangelhaften Haftfähigkeit der Körperzellen für das deponierte Fett und in einem enorm gesteigerten Bedarf an Verbrennungsmaterial von seiten der Zellen liegen. Denn auch dies in Zirkulation geratene Fett wird rasch nach seiner Aufnahme in den Zellen weiter zersetzt. So kommt es, daß der vornehmlich mit Fett ernährte avitaminöse Körper fast ebenso schlecht hinsichtlich seines Fettgehaltes gestellt ist wie der mit reiner Eiweißnahrung ernährte Körper.

Bei reiner Kohlehydratnahrung neben einem Eiweißminimum, die also viel Fettquellen enthält, wird der normale Körper abnorm fettreich, nur nicht ganz so fettreich wie bei der Fettfütterung. Der avitaminöse Körper aber zersetzt die Kohlehydrate, zum Teil nach ihrer Überführung in Glykogen, wobei aber das Glykogen fast ebenso rasch wieder verschwindet, wie es hergestellt wurde [*Collazo* und *Rubino*[1])]. Nun findet im normalen Körper in der Regel erst dann eine Fettbildung aus Kohlehydrat statt, wenn die Glykogenkammern gefüllt sind. Da nun im avitaminösen Körper es wohl niemals zu einer völligen Füllung der Glykogenkammern kommt, wird gebildetes Glykogen gleich wieder umgesetzt, und das könnte ein Grund sein, warum es hier nicht zu einer Fettbildung aus Kohlehydrat kommt. Aber das muß nicht notwendig zutreffen. Es könnte auch das Kohlehydrat im avitaminösen Körper noch in Fett verwandelt werden, aber das entstandene Fett könnte sofort wieder weiter in den Zellen umgesetzt werden.

Ich wende mich nunmehr meinen Untersuchungen über den Cholesteringehalt des avitaminösen Körpers zu.

---

[1]) *Collazo* und *Rubino*, diese Zeitschr. 1923.

Einiges ist über diesen Gegenstand schon gearbeitet worden. Der Gehalt an Lipoidsubstanzen im Blute wurde von *Collazo* und *Bosch* (l. c.), speziell auch der Cholesteringehalt des Blutes von denselben Autoren nach der *Bang*schen Methode bei der Avitaminose im hiesigen Institut untersucht. Dazu ist allerdings zu bemerken, daß die Cholesterinbestimmung bei der *Bang*schen Methode nicht direkt geschieht, sondern nur die Differenz bei einer Fraktion darstellt. Das Ergebnis war folgendes: Der Phosphatidgehalt des Blutes wird durch die Avitaminose nicht deutlich verändert, manchmal wenig herabgesetzt (*Collazo* und *Bosch*, l. c.); der Cholesteringehalt des Blutes aber vermehrt. *Lawaczek*[1]) fand, daß der Cholesteringehalt des Blutes und der Skelettmuskulatur bei Beriberi-Tauben gesteigert ist. Am Herzmuskel wurde diese Steigerung vermißt. Das gilt sowohl für die frische Organsubstanz, als auch für die Trockensubstanz, die vermindert war. Die Gesamt-H_3PO_4 und die Rest-H_3PO_4, auf die Muskeltrockensubstanz berechnet, war normal, auf die frische Muskulatur bezogen, aber vermindert. *Ciaccio*[2]) stellte eine inkonstante Verminderung des Phosphatidgehalts der Muskulatur bei beriberikranken Tauben fest. *Stepp*[3]) sah die Galle eines avitaminösen Hundes an Cholesterin verarmen.

Hierher gehören endlich auch jene anatomischen Befunde von *Iwa-Buchi*[4]), aus denen hervorgeht, daß in der Nebenniere skorbutischer Meerschweinchen in der mittleren Schicht eine hochgradige Lipoidverarmung Platz greift, die zu einem fast völligen Schwinden der doppeltbrechenden Substanz führt, und daß die Nebenniere einen herabgesetzten Gehalt an Phosphor und Kalk zeigt. (Dieser Autor fand auch eine Herabsetzung des Fettgehalts der Muskulatur.)

Ich habe nun gefunden, daß im Vergleich zum Gesamtfett der Cholesteringehalt des Gesamtkörpers (Cholesterin + unbekannte unverseifbare Substanz nach *Kumagawa*) im Vergleich zum Normalkörper Werte erkennen läßt, wie sie in der folgenden Tabelle zusammengestellt sind.

Aus diesen Analysenergebnissen geht für den vitaminhaltigen Körper hervor, daß der Prozentgehalt an Cholesterin am größten ist bei Fettkost, dann folgt die Kohlehydratkost (Stärke, Rohrzucker), dann die gemischte Kost, bei der es ziemlich irrelevant ist, ob das Tier mit ihr kalorisch suffizient oder insuffizient ernährt wird, und an letzter Stelle steht die reine Eiweißkost. Aus dieser Abhängigkeit des Cholesteringehaltes des gesamten Körpers von der Art der Ernährung ergibt sich die innige Abhängigkeit des Cholesteringehaltes des Körpers von der Nahrung. Es steht der Cholesteringehalt des Körpers vornehmlich in Beziehung zu dem Nahrungsfett oder denjenigen Komponenten der Nahrung, aus denen der Körper am leichtesten Fett

[1]) *Lawaczeck*, Hoppe-Seylers Zeitschr. f. phys. Chem. **125**, H. 5/6, S. 229.
[2]) *Ciaccio*, Arch. di Farmac. sperim. e Scienze affini **24**, 1917.
[3]) *Stepp*, Zeitschr. f. Biol. **69**, 514, 1919.
[4]) *Iwa-Buchi*, Zeitschr. f. d. ges. exper. Med. **30**, H. 1/2, S. 65, 1922; Beitr. z. path. Anat. u. z. allg. Path. **70**, H. 3, S. 440, 1922.

bilden kann, nämlich den Kohlehydraten. Bei reiner Eiweißkost wird der Körper erstaunlich cholesterinarm.

	Durchschnittswert des Gesamtfettgehalts des frischen Körpers Proz.	Durchschnittswert des Cholesteringehalts des frischen Körpers Proz.	Der aus d. absoluten Analysenzahlen pro Tier berechnete lipozytische Koeffizient $\left(\frac{\text{Cholesterin}}{\text{Totalfettsäure}}\right)$
Vitaminhaltige gemischte Kost nach *Funk* . . .	10,203	1,024	0,110
Vitaminhaltige gemischte Kost	10,280	1,405	0,160
Vitaminfreie gemischte Kost	6,230	1,298	0,285
Vitaminhalt. Eiweißkost	5,601	0,707	0,147
Vitaminfreie Eiweißkost	2,577	0,365	0,170
Vitaminhaltige Fettkost mit Eiweißminimum .	14,446	2,280	0,188
Vitaminfreie Fettkost mit Eiweißminimum . . .	3,066	0,674	0,275
Vitaminhalt. Rohrzuckerkost m. Eiweißminimum	12,472	1,256	0,110
Vitaminfreie Rohrzuckerkost m. Eiweißminimum	4,808	0,921	0,253
Vitaminhalt. Stärkekost mit Eiweißminimum . .	11,104	1,367	0,135
Vitaminfreie Stärkekost mit Eiweißminimum . .	4,506	0,842	0,223
Vitaminhaltige gemischte Kost b. Unterernährung	2,965	1,019	0,514

Werden nun dem Körper, der in dieser Weise verschieden ernährt ist, gleichzeitig alle Vitamine entzogen, so leidet, an der Lebensdauer und der Körpergewichtsabnahme gemessen, die gesamte Ernährung des Körpers, wie ich[1]) in einer früheren Arbeit nachwies, am wenigsten bei gemischter Kost und etwas mehr bei der Kohlehydratkost, noch mehr bei der Fettkost und am meisten bei der reinen Eiweißkost. Die Werte für den Fettgehalt des Körpers verlaufen bei diesen verschiedenen Arten der Ernährung in ganz derselben Reihenfolge, d. h. der Fettgehalt ist am größten bei gemischter Kost, dann folgt die Kohlehydratkost, dann die Fettkost und schließlich die Eiweißkost.

Es zeigt nun eine Rechnung, bei der man die Abnahme von Fett und Cholesterin in den entsprechend ernährten Körpern durch die Vitaminfreiheit der Nahrung prozentig berechnet, daß immer das Fett stärker abnimmt durch den Vitaminmangel, als das Cholesterin abnimmt. Bei der gemischten Nahrung ist das so deutlich, daß es schon auf den ersten Blick auffällt.

[1]) *K. Asada*, diese Zeitschr. 139, 1923.

	Fettabnahme des Körpers beim Vitaminmangel Proz.	Cholesterinabnahme des Körpers beim Vitaminmangel Proz.
Gemischte Kost	39,3	7,6
Zuckerkost	61,2	26,7
Stärkekost	59,4	38,4
Fettkost	78,8	70,4
Eiweißkost	55,3	48,4

Nun besteht weiterhin eine Beziehung zwischen dem Cholesterin- und Phosphatidgehalt des Körpers, indem beide Stoffe immer nebeneinander vorkommen. Der Phosphor ist aber in den Weichteilen des Körpers wohl in großem Umfange als Phosphatidphosphor enthalten. Nun hat *Morinaka*[1]) im hiesigen Laboratorium nachgewiesen, daß auch nach forcierter Lecithinfütterung das bei der avitaminösen Ernährung nach der Fetteinschmelzung übrig bleibende Zellgewebe des Mäuse- und Rattenkörpers, auf die Asche berechnet, einen im wesentlichen normalen Phosphorgehalt hat, während *Naito*[2]) in der Leber des avitaminösen Tieres bei forcierter Lecithinfütterung eine Lecithinverarmung im Vergleich zu der Leber des vitaminhaltig und forciert mit Lecithin ernährten Tieres nachweisen konnte bei der Berechnung auf das frische Organ. *Lawaczeck* (l. c.) fand bei Beriberi-Tauben die Gesamtphosphorsäure, wie die Restphosphorsäure im Muskel, auf das frische Organ berechnet, vermindert, auf die Trockensubstanz berechnet, aber normal. Die Trockensubstanz dieser Muskulatur war aber an sich schon subnormal. Das Cholesterin hat, soviel wir wissen, nichts mit dem Skelett, sondern höchstens nur mit den Weichteilen des Körpers etwas zu tun. Das Cholesterin nimmt also bei der Avitaminose jedenfalls stärker ab als der Gesamtphosphor der Weichteile, der wahrscheinlich in ihnen in normalem Prozentgehalt bleibt; aber das Cholesterin nimmt bei der Avitaminose nicht entfernt so stark ab als das Fett. Alles das zeigt, daß der Fett-Cholesterin- und Phosphorstoffwechsel in weitgehender Unabhängigkeit voneinander bei der Avitaminose verlaufen. Diese Unabhängigkeit dokumentiert sich darin, daß das Fett bei jeglicher Art der Ernährung in größtem Umfange einschmilzt und daß neues Fett kaum mehr im Körper zurückgehalten wird; ob es vermindert gebildet wird, kann nicht gesagt werden.

Das Cholesterin, soweit es aus der Nahrung stammt oder soweit es noch gebildet wird, wird nur noch in vermindertem Umfange als

---

[1]) *Morinaka*, diese Zeitschr. **133**, H. 113, 1922 und noch unveröffentlichte Versuche.

[2]) *Naito*, nach dem Manuskript zitiert.

solches vom Körper zurückgehalten; da der Gesamtkörper an Cholesterin nach meinen Versuchen prozentig verarmt, müssen auch die ursprünglichen Cholesterinvorräte des Körpers im Verlaufe der Avitaminose allmählich verloren gegangen sein. Das Cholesterin muß also in den früheren Stadien der Avitaminose wohl auch in verstärktem Maße ausgeschieden worden sein. Später wird es dann, wie *Stepp* (l. c.) fand, in vermindertem Maße ausgeschieden, weil eben nicht mehr viel davon im Körper vorhanden ist, vielleicht auch nicht mehr viel gebildet wird, wofern das Nahrungscholesterin nicht die einzige Cholesterinquelle des Körpers ist.

In hohem Grade unabhängig von der genannten Fettstoffwechselstörung aber verläuft die hier geschilderte Störung des Cholesterinstoffwechsels insofern, als der Körper relativ cholesterinreicher als fettreich bleibt. Dabei kann natürlich der absolute Cholesteringehalt einzelner Organe bei der Avitaminose sogar zunehmen im Vergleich zur Norm, wie das *Lawaczek* für den Skelettmuskel und das Blut fand, sowohl bei Berechnung auf die frische, wie auch auf die trockene Muskelsubstanz. Aber der vermehrte Cholesteringehalt der Muskulatur bei den Beriberi-Tauben von *Lawaczeck* ist wahrscheinlich durch das in den Muskeln eingeschlossene Blut bedingt, weil der Cholesteringehalt des Gesamtkörpers vermindert ist. Die Cholesterämie (vermehrter Cholesteringehalt des Blutes) findet in der Lipämie bei der Avitaminose ihr Gegenstück. Das deutet darauf hin, daß es sich hier um *Transportphänomene* handelt, daß entweder das Nahrungscholesterin und -fett nicht rasch genug von den Zellen aufgenommen werden oder daß — vielleicht ist das gleichzeitig der Fall — aus den Geweben größere Cholesterin- und Fettmengen in das Blut abströmen. An eine Ausscheidungsinsuffizienz für das Cholesterin von seiten der Leber muß man natürlich gleichfalls denken, wenn man dafür auch noch keinen besonderen Anhaltspunkt hat.

Hier sei endlich noch einmal auf die bekannte Beobachtung, die auch meine Versuche aufs neue bestätigen, hingewiesen, daß im Hunger oder bei Unterernährung mit Vitaminzufuhr das Körperfett fast schwindet, während der Cholesteringehalt hoch bleibt. *Rothschild*[1]) will sogar eine Cholesterinvermehrung beim hungernden Kaninchen in Blut, Leber und Nebenniere gefunden haben. In meinen Versuchen fand ich bei gemischter vitaminhaltiger Ernährung für die Fett- bzw. Cholesterinabnahme des Körpers infolge Unterernährung folgende Werte:

Fettabnahme.	71,2 Proz.
Cholesterinabnahme	27,5 „

[1]) *Rothschild*, Zieglers Beiträge **60**, 227, 1915.

Es verhält sich demnach der vitaminfrei ernährte Körper ähnlich wie der vitaminhaltig, aber unterernährte Körper, indem in beiden Fällen die Fettabnahme stärker ist als die Cholesterinabnahme; nur ist bei der Unterernährung und beim Hunger der Unterschied zwischen der Fett- und Cholesterinabnahme bedeutend größer als bei der avitaminösen Ernährung.

Anders ausgedrückt, zeigt der hungernde, aber vitaminreich ernährte Körper im Vergleich zum Fett eine starke Cholesterinvermehrung. der avitaminöse Körper zeigt dasselbe Phänomen, nur in etwas abgeschwächter Form.

Während nun zwischen der Störung des Fett- und Cholesterinstoffwechsels bei der Avitaminose nur insofern ein Unterschied besteht, als die erstere an Intensität die letztere übertrifft, aber beide doch in derselben Richtung verlaufen, zeigt der Phosphorstoffwechsel, soweit es sich um den Weichteilphosphor handelt, keine so auffällige Störung. abgesehen vielleicht von einer Verschiebung in dem Verhältnis des Lecithinphosphors zum übrigen Phosphor in der Leber, wie das aus den *Naito*schen Versuchen mit forcierter Lecithinfütterung hervorzugehen scheint. — Endlich ist hier noch auf folgende Tatsache hinzuweisen: Der Prozentgehalt des Körpers an Cholesterin wird bei den verschiedenen Arten der Ernährung durch die Vitaminfreiheit der Nahrung — abgesehen davon, daß der Cholesteringehalt in allen Fällen abnimmt — noch obendrein insofern besonders verändert, als bei vitaminhaltiger Nahrung die Fettnahrung den Körper am cholesterinreichsten macht, als aber bei vitaminfreier Nahrung die Fettnahrung den Körper in einem im Vergleich zu allen anderen Nahrungsarten ganz ungewöhnlich hohem Maße cholesterinarm macht. Warum verliert nun der avitaminöse Körper bei der Fettnahrung so viel Cholesterin, obwohl diese gleiche Nahrung bei der Gegenwart von Vitamin so viel Cholesterin erzeugt?

Auch hier geht die Störung parallel mit der Störung des Fettstoffwechsels. Denn die vitaminhaltig mit Fett ernährten Tiere haben den höchsten, die vitaminfrei mit Fett ernährten Tiere aber mit Ausnahme der Eiweißtiere den niedrigsten Fettgehalt.

Reihenfolge der proz. Fett- und Cholesterinwerte des Körpers bei den verschiedenen Arten der Ernährung in vitaminhaltigem und vitaminfreiem Zustande.

(Die oberste Reihe gibt die höchsten, die unterste die niedrigsten Werte an.)

Vitaminhaltig		Vitaminfrei	
	Fettwert		
Fett . . .	Nahrung	Gemischte .	Nahrung
Zucker . .		Zucker . .	
Stärke . .		Stärke . .	
Gemischte .		Fett . . .	
Eiweiß . .		Eiweiß . .	

Cholesterinwerte

Vitaminhaltig		Vitaminfrei	
Fett . . .	Nahrung	Gemischte .	Nahrung
Gemischte .		Zucker . .	
Stärke . .		Stärke . .	
Zucker . .		Fett . . .	
Eiweiß . .		Eiweiß . .	

Reihenfolge der Lebensdauer der Tiere bei den verschiedenen Nahrungsarten. (Die oberste Reihe gibt die längste, die unterste Reihe die kürzeste Lebensdauer an).

Vitaminhaltige Ernährung			Vitaminfreie Ernährung	
Gemischte	Ohne Unterschied, so lange die Beobachtung dauerte.	Nahrung	Gemischte .	Nahrung
Fett . .			Zucker . .	
Zucker .			Stärke . .	
Stärke			Fett . . .	
Eiweiß			Eiweiß . .	

Ergebnisse.

1. Bei der Avitaminose nimmt der prozentige Totalfettgehalt wie auch der Neutralfettgehalt des Körpers, auf die frische Körpersubstanz berechnet, ab.

2. Bei der Avitaminose ist der Körper am fettreichsten bei gemischter Nahrung, er enthält weniger Fett bei vorwiegender Kohlehydratkost, noch weniger Fett bei vorwiegender Fettkost, und am wenigsten Fett bei reiner Eiweißkost, während der Normalkörper am fettreichsten bei vorwiegender Fettkost, etwas weniger fettreich bei vorwiegender Kohlehydratkost, noch weniger fettreich bei gemischter Kost und am fettärmsten bei reiner Eiweißkost ist.

3. Im Gegensatz zum Normalkörper beeinflußt eine vornehmlich fetthaltige Nahrung den Fettgehalt des avitaminösen Körpers am ungünstigsten.

4. Da bei der vornehmlichen Fettnahrung der avitaminöse Körper fettärmer wird als bei vornehmlicher Kohlehydratnahrung, wirkt Kohlehydratzufuhr fettsparend im Gegensatz zur Fettzufuhr, woraus folgt, daß bei der Avitaminose in erster Linie das Kohlehydrat, in zweiter Linie das Fett in gesteigertem Umfange verbraucht wird. Eine nennenswerte Fettbildung aus Kohlehydrat ist bei der Avitaminose zum mindesten nicht *nachweisbar.* Wenn sie vorhanden ist, muß das gebildete Fett sofort wieder zerstört werden.

5. Da der avitaminöse Körper — abgesehen von dem Falle der reinen Eiweißfütterung — um so fettärmer wird, je mehr Fett er mit der Nahrung bekommt, müssen die Vitamine, vielleicht gerade der Vitaminfaktor A neben den anderen Faktoren, im Sinne der Fettbindung und Fettstapelung und damit auch im Sinne einer Ein-

schrär kung der Fettzerstörung wirken, wie das auch von ihrem Einfluß auf die Kohlehydrate (Glykogen) bekannt ist.

6. Die Fettarmut des vitaminfreien Körpers bei reiner Eiweißkost erklärt sich in erster Linie aus dem Kohlehydrat-, in zweiter Linie aus dem Fettmangel der Nahrung, und ferner aus der gesteigerten Fettzerstörung im avitaminösen Zustande.

7. Der relativ hohe Fettgehalt des avitaminösen Körpers bei gemischter Kost erklärt sich einmal aus der Tatsache, daß nach meinen früheren Untersuchungen überhaupt der vitaminfreie Körper hinsichtlich Lebensdauer und Körpergewichtsbestand, also für die annähernde Aufrechterhaltung der normalen Funktionen am besten gestellt ist bei der gemischten Nahrung, ferner daß hierbei die Kohlehydrate ihren fettsparenden Einfluß geltend machen können. Wenn bei der Avitaminose auch in erster Linie der Kohlehydratstoffwechsel, in zweiter Linie erst der Fettstoffwechsel, und gar in dritter Linie erst der Eiweißstoffwechsel gestört ist, so leidet doch schließlich der Stoffwechsel aller organischen Nahrungskomponenten Not, und so muß auch der avitaminöse Körper um so empfindlicher getroffen werden, je mehr eine Quote seines gesamten organischen Stoffwechsels durch eine einseitige Ernährung belastet wird. Dann tritt aber leicht eine völlige Insuffizienz dieser Quote durch Überlastung ein, und da die anderen Quoten mehr oder weniger ausgeschaltet sind, können sie nicht unterstützend eingreifen. Darum sinkt im allgemeinen das Körpergewicht um so mehr, und die Lebensdauer der Tiere bei der Avitaminose wird um so mehr verkürzt, je einseitiger die Ernährung ist. Aber auch hier wirkt die vornehmliche Fettnahrung, abgesehen von der reinen Eiweißnahrung, am schädlichsten.

8. Der Cholesteringehalt des avitaminösen Körpers ist, auf die frische Körpersubstanz berechnet, entsprechend dem Totalfettgehalt vermindert im Vergleich zur Norm. Im Vergleich zur Fettabnahme ist aber die Cholesterinabnahme bei der Avitaminose im Körper geringer.

9. Bei der Unterernährung mit vitaminhaltiger gemischter Kost nimmt der Fettgehalt des Körpers stärker ab als in der Avitaminose bei gemischter Kost. Im Vergleich zum Fettgehalt ist der Cholesteringehalt des Körpers bedeutend höher.

10. Die hier mitgeteilten Befunde über das Verhalten der Fette bei der Avitaminose (die Erhöhung des Blutfettgehaltes bei Verminderung des Fettgehaltes des gesamten Organismus, die notwendige Annahme einer stärkeren Fettverbrennung und einer verminderten Fettstapelung) lassen erkennen, daß eine Störung der *Fettbewegung*, und zwar ein vermehrter Transport des Körper- und Nahrungsfettes zu den Stätten der Fettverbrennung vorliegt (vgl. hierzu die Anschauungen von *W. Arnoldi*).

Die in den vorliegenden Untersuchungen zutage tretenden interessanten Beziehungen zwischen Fett- und Kohlehydratstoffwechsel bedürfen noch einer weiteren Bearbeitung.

Versuchsprotokolle.

Versuchsanordnung.

Die Versuchstiere waren junge Ratten von ungefähr gleichem Alter. Diese hatte ich in zwölf Gruppen geteilt; sieben Gruppen wurden mit vitaminhaltiger Nahrung, fünf Gruppen mit vitaminfreier Nahrung gefüttert. Alle Tiere wurden nach 5½-wöchiger Versuchsdauer mit Äther getötet. Die ganzen Tierkörper wurden nach vorheriger Abwaschung des Felles mit Äther und Reinigung des Magendarmkanals von seinem Inhalt in 30proz. (eventuell 30 g/dl-iger) Natronlauge aufbewahrt, natürlich jedes Tier in einem Gefäß für sich (näheres siehe unter „Methodik"). Die Fütterung der Tiere wurde so vorgenommen, daß jede Gruppe, die in einem besonderen Käfig untergebracht war, am Morgen ihr Eiweißminimum mit Salzgemisch und den frischen oder — bei den avitaminösen Gruppen — den autoklavisierten Mohrrüben nebst destilliertem Wasser bekam. Nachdem diese Morgenportion aufgefressen war, bekam jede Gruppe die Futterzulage, die sie nach Belieben fressen konnte, nämlich destilliertes Wasser, Eiweiß oder Speck oder Weizenstärke oder Rohrzucker, oder alle diese Nahrungsbestandteile in bestimmtem Verhältnis gemischt. Die Abendmahlzeit war immer so reichlich bemessen, daß am folgenden Morgen noch Futter im Napfe war. Diese Futterreste wurden dann entfernt und wieder die Morgenmahlzeit gegeben.

Auf ein Tier berechnet, bestand die Mahlzeit aus:

Weizeneiweiß	0,5 g	Eiweißminimum
Casein	0,5 g	
Salzgemisch	0,3 g	
Mohrrüben frisch	3,0 g	
oder		
Mohrrüben getrocknet	0,4 g	

3 g frische Mohrrüben entsprechen 0,4 g getrockneten und dann im Autoklaven erhitzten Mohrrüben. Der Wassergehalt der Mohrrüben beträgt 86,7 Proz.

Das Salzgemisch hatte folgende Zusammensetzung:

$Ca_3(PO_4)_2$	10,0 g
K_2HPO_4	37,0 g
NaCl	20,0 g
Natriumzitrat	15,0 g
Mg-Zitrat	8,0 g
Calciumzitrat	8,0 g
Eisenzitrat	2,0 g

Die gemischte Nahrung, die bestimmte Gruppen als Abendmahlzeit erhielten, hatte folgende Zusammensetzung:

Weizeneiweiß	1,1 Teil
Casein	1,1 „
Speck	3,0 „
Weizenstärke	2,7 „
Rohrzucker	1,8 „
Destilliertes Wasser	q, s

Da die mit Eiweiß + Vitamin allein, oder die mit Eiweiß oder einem Eiweißminimum + Fett oder Zucker oder Stärke aber vitaminfrei ernährten Tiere bei dieser einseitigen Nahrung zu kurz leben, als daß der ganze Körper völlig vitaminfrei werden könnte, habe ich alle diese Tiere, also die Gruppen Nr. 6, 9, 10, 11, 12 zunächst 4 Wochen bei gemischter Nahrung (Nr. 6 vitaminhaltig, Nr. 9, 10, 11, 12 vitaminfrei) gehalten und ihnen dann $1\frac{1}{2}$ Wochen lang die vorgeschriebene einseitige Nahrung gegeben und die Tiere nach dieser Zeit getötet.

Gruppen mit vitaminhaltiger Nahrung.

1. Gruppe („*Funks* normale Fütterung") 4 Ratten.

Morgenportion:	1. Weizeneiweiß	1,1 g pro Ratte
	2. Casein	1,1 g „ „
	3. Salzgemisch	0,3 g „ „
	4. Destilliertes Wasser . . .	q. s.
Abendportion:	1. Rohrzucker	1,0 g „ „
	2. Weizenstärke	2,7 g „ „
	3. Butter	10,0 g „ „
	4. Speck	2,0 g „ „
	5. Agar	0,3 g „ „
	6. Hefeauszug	0,6 g „ „

2. Gruppe („gemischte Gruppe") 3 Ratten.

Morgenportion:	1. Weizeneiweiß	0,5 g pro Ratte	
	2. Casein	0,5 g „ „	
	3. Salzgemisch	0,3 g „ „	
	4. Mohrrüben (frisch) . . .	3,0 g „ „	
	5. Destilliertes Wasser . .	q. s.	
Abendportion:	1. Speck	3,0 Teile	nach Belieben.
	2. Weizeneiweiß + Casein . .	2,2 „	
	3. Weizenstärke	2,7 „	
	4. Rohrzucker	1,8 „	
	5. Destilliertes Wasser . .	q. s.	

3. Gruppe („Stärkegruppe") 4 Ratten.

Morgenportion:	1. Weizeneiweiß	0,5 g pro Ratte
	2. Casein	0,5 g „ „
	3. Salzgemisch	0,3 g „ „
	4. Mohrrüben (frisch) . . .	3,0 g „ „
	5. Destilliertes Wasser . .	q. s.
Abendportion:	1. Weizenstärke	nach Belieben.
	2. Destilliertes Wasser . .	

4. Gruppe („Zuckergruppe") 3 Ratten.

Morgenportion:	1. Weizeneiweiß	0,5 g pro Ratte
	2. Casein	0,5 g „ „
	3. Salzgemisch	0,3 g „ „
	4. Mohrrüben (frisch) . . .	3,0 g „ „
	5. Destilliertes Wasser . .	q. s.
Abendportion:	1. Rohrzucker	nach Belieben.
	2. Destilliertes Wasser . .	

5. Gruppe („Fettgruppe") 5 Ratten.

Morgenportion:
1. Weizeneiweiß . . . . . 0,5 g pro Ratte
2. Casein . . . . 0,5 g „ „
3. Salzgemisch . . . . . . 0,3 g „ „
4. Mohrrüben (frisch) . . . 3,0 g „ „
5. Destilliertes Wasser . . q. s.

Abendportion:
1. Speck . . . . }
2. Destilliertes Wasser . . } nach Belieben.

6. Gruppe („Eiweißgruppe") 3 Ratten.

Morgenportion:
1. Weizeneiweiß . . . . . 1,1 g pro Ratte
2. Casein . . . . 1,1 g „ „
3. Salzgemisch . . . . . . 0,3 g „ „
4. Mohrrüben (frisch) . . . 3,0 g „ „
5. Destilliertes Wasser . . . q. s.

Abendportion:
1. Weizeneiweiß . . . . . }
2. Casein . . . . } nach Belieben.
3. Destilliertes Wasser . . }

7. Gruppe („unterernährte gemischte Gruppe") 5 Ratten.

Mit Hilfe dauernder Kontrolle des Körpergewichts wurde die tägliche Nahrungsration abgemessen, so daß der Zustand einer Unterernährung erzielt wurde. Die Ernährung war im übrigen diejenige der zweiten Gruppe.

Gruppen mit vitaminfreier Nahrung.

8. Gruppe („gemischte Gruppe") 4 Ratten.

Morgenportion:
1. Weizeneiweiß (Autoklav) 0,5 g pro Ratte
2. Casein („) 0,5 g „ „
3. Getr. Mohrrüben („) 0,4 g „ „
4. Salzgemisch . . . . 0,3 g „ „
5. Destilliertes Wasser . . . . q. s.

Abendportion (nach Belieben):
1. Speck (Autoklav) . . . . 3,0 Teile
2. Weizeneiweiß (Autoklav) + Casein („) 2,2 „
3. Weizenstärke . . . . 2,7 „
4. Rohrzucker . . . . 1,8 „
5. Destilliertes Wasser . . . q. s.

9. Gruppe („Stärkegruppe") 3 Ratten.

Morgenportion:
1. Weizeneiweiß (Autoklav) 0,5 g pro Ratte
2. Casein („) 0,5 g „ „
3. Getr. Mohrrüben („) 0,4 g „ „
4. Salzgemisch . . . . 0,3 g „ „
5. Destilliertes Wasser . . . . q. s.

Abendportion:
1. Weizenstärke . . . . }
2. Destilliertes Wasser . . . } nach Belieben.

10. Gruppe („Zuckergruppe") 3 Ratten.

Morgenportion:
1. Weizeneiweiß (Autoklav) 0,5 g pro Ratte
2. Casein („) 0,5 g „ „
3. Getr. Mohrrüben („) 0.4 g „ „
4. Salzgemisch . . . . 0,3 g „ „
5. Destilliertes Wasser . . . q. s.

Abendportion:
1. Rohrzucker . . . . }
2. Destilliertes Wasser . . . } nach Belieben.

11. Gruppe („Fettgruppe“) 4 Ratten.

Morgenportion:
1. Weizeneiweiß (Autoklav) 0,5 g pro Ratte
2. Casein („) 0,5 g „ „
3. Getr. Mohrrüben („) 0,4 g „ „
4. Salzgemisch . . . . 0,3 g „ „
5. Destilliertes Wasser . . . q. s.

Abendportion:
1. Speck (Autoklav) . . . . } nach Belieben.
2. Destilliertes Wasser . . . }

12. Gruppe („Eiweißgruppe“) 3 Ratten.

Morgenportion:
1. Weizeneiweiß (Autoklav) 1,1 g pro Ratte
2. Casein („) 1,1 g „ „
3. Getr. Mohrrüben („) 0,4 g „ „
4. Salzgemisch . . . . 0,3 g „ „
5. Destilliertes Wasser . . . q. s.

Abendportion:
1. Weizeneiweiß + Casein (Autoklav) } nach
2. Destilliertes Wasser . . . . } Belieben.

Tabelle des Körpergewichts der lebenden Tiere.
(Zur Illustration der Körpergewichtsveränderungen im Verlauf der Beobachtungszeit.)

Versuchstag	Nummer des Tieres				
	a	b	c	d	e
	Körpergewicht in g				
	1. Gruppe („*Funks* normale Fütterung“).				
1.	75	82	60	80	—
7.	75	90	57	85	—
15.	77	95	57	83	—
22.	80	93	60	84	—
29.	81	97	57	87	—
36.	80	95	58	83	—
38.	79	96	57	81	—
	2. Gruppe („gemischte Nahrungsgruppe“).				
1.	62	80	58	—	—
7.	64	78	62	—	—
15.	70	75	68	—	—
22.	72	82	64	—	—
29.	76	87	62	—	—
36.	70	83	60	—	—
38.	75	86	66	—	—
	3. Gruppe („Stärkegruppe“).				
1.	32	66	70	67	—
7.	35	60	63	63	—
15.	39	65	67	63	—
22.	35	63	68	62	—
29.	38	70	70	60	—
36.	38	66	68	57	—
38.	35	64	66	52	—
	4. Gruppe („Zuckergruppe“).				
1.	67	56	58	—	—
7.	60	50	60	—	—
15.	58	52	61	—	—
22.	64	50	65	—	—
29.	60	52	70	—	—
36.	62	49	70	—	—
38.	63	49	67	—	—

Tabelle des Körpergewichts der lebenden Tiere. (Fortsetzung.)

Versuchstag	a	b	c	d	e
	Körpergewicht in g				
	5. Gruppe („Fettgruppe“).				
1.	71	35	40	50	40
7.	65	40	45	43	46
15.	70	42	50	45	49
22.	70	40	53	47	48
20.	74	45	56	48	50
30.	75	45	58	50	51
38.	77	46	54	47	51
	6. Gruppe („Eiweißgruppe“).				
1.	75	170	50	—	—
7.	70	168	55	—	—
15.	72	170	55	—	—
22.	75	175	58	—	—
29.	78	180	60	—	—
26.	65	165	50	—	—
38.	61	160	48	—	—
	7. Gruppe („unterernährte gemischte Nahrungsgruppe“).				
1.	93	75	78	88	75
7.	89	74	70	75	69
15.	79	60	67	65	60
22.	70	53	55	62	57
29.	65	45	49	57	45
36.	58	38	38	45	40
38.	55	32	34	39	31
	8. Gruppe („gemischte Nahrungsgruppe“) vitaminfrei!				
1.	72	70	70	57	—
7.	69	65	68	57	—
15.	65	61	68	47	—
22.	63	60	62	43	—
29.	62	60	57	43	—
36.	60	58	55	40	—
38.	57	55	53	35	—
	9. Gruppe („Stärkegruppe“) vitaminfrei!				
1.	72	73	73	—	—
7.	71	70	70	—	—
15.	65	65	67	—	—
22.	65	57	66	—	—
29.	62	50	55	—	—
36.	55	48	52	—	—
38.	46	39	47	—	—
	10. Gruppe („Zuckergruppe“) vitaminfrei!				
1.	80	87	77	—	—
7.	77	85	75	—	—
15.	75	83	70	—	—
22.	70	83	67	—	—
29.	62	72	57	—	—
36.	60	70	55	—	—
38.	59	67	46	—	—

Tabelle des Körpergewichts der lebenden Tiere. (Fortsetzung.)

Versuchstag	Nummer des Tieres a	b	c	d	e
	Körpergewicht in g				
	11. Gruppe („Fettgruppe") vitaminfrei!				
1.	80	78	70	70	—
7.	70	72	63	59	—
15.	72	70	60	60	—
22.	67	73	50	57	—
29.	52	75	50	55	—
36.	49	68	39	42	—
38.	43	62	34	39	—
	12. Gruppe („Eiweißgruppe") vitaminfrei!				
1.	85	80	79	—	—
7.	79	75	73	—	—
15.	80	72	74	—	—
22.	75	70	74	—	—
29.	72	60	62	—	—
36.	60	51	50	—	—
38.	53	45	46	—	—

Methodik.

Nach *Sekita*[1]) finden sich im Fettgehalt der Mäuse von verschiedenen Würfen beträchtliche Unterschiede. Aus diesem Grunde wollte ich eigentlich auch die Ratten für meine Versuche vom gleichem Wurfe haben, doch war es mir nicht möglich, so viel Würfe zu bekommen, als ich nötig hatte. Ich nahm deshalb Tiere aus verschiedenen Würfen, aber von ungefähr gleichem Alter. Die Tiere wurden genau so gefüttert, wie die Tiere, über die ich in meiner Arbeit „Über die Wirkung einseitiger Ernährung bei Avitaminose" berichtet habe. Da in dem Terminalstadium der Avitaminose sich zu der avitaminösen Stoffwechselstörung oft echter Hunger infolge mangelhafter Nahrungsaufnahme hinzugesellt, tötete ich deshalb die Tiere schon nach 5½ Wochen Lebensdauer und bewahrte sie in Natronlauge auf. Die Tiere wurden mit Äther rasch getötet. (*Bang* stellt zwar fest, daß bei Äthernarkose eine vorübergehende Fettvermehrung im Blute des Hundes auftritt, doch ist das ohne Einfluß auf meine Analyse.) Nach dem Tode wurde jedes Tier gleich mit Äther äußerlich abgewaschen, um das Speisefett zu entfernen. Bei der Analyse wurde der Magen und Blinddarm allein mit dem Messer geöffnet und die darin befindliche Kotmasse entfernt. Der übrige Darm wurde durch Fingerdruck entleert und dann das Tier gewogen. Bei der Fettbestimmung habe ich mich der Methode von *Kumagawa-Suto* bedient.

Bei der Verseifung habe ich nach *Shimidzu*[2]), *Shibata*[3]) und *Sekita*[4]) gearbeitet. Die Seifenlösung wurde in Meßkolben bis zur bestimmten Menge mit Lauge aufgefüllt und gut gemischt. Hiervon wurde entsprechend der Menge des Fettes $^1/_{10}$ bis $^1/_{20}$ abpipettiert und weiter nach *Kumagawa-Suto* verarbeitet. Da die unverseifbaren Substanzen zum großen Teil aus Cholesterin bestehen, wurden sie einfach als Cholesterin in Rechnung gestellt. In den folgenden Tabellen sind die Körpergewichte nach der Ätherwaschung des Felles und der Entfernung des Magendarminhalts angegeben.

---

[1]) *N. Sekita*, Mitt. a. d. med. Fak. d. Kaiserl. Universität zu Tokio **28**, H. 2, S. 199—254, 1922. — [2]) *Y. Shimidzu*, diese Zeitschr. **28**, 237—273, 1910. — [3]) *M. Shibata*, ebendaselbst **37**, 345, 1911. — [4]) *Sekita*, l. c.

Analysentabelle.

A. Gruppen mit vitaminhaltiger Nahrung.

Ratte	Körpergewicht (Frischsubstanz ausschl. Magen u. Darminhalt)	Petroläther-extrakt g	Gesamtfett Proz.	Cholesterin g	Cholesterin Proz.	Hochmolekulare Fettsäure g	Neutralfett Proz.	Lipozytischer Koeffizient	Bemerkungen
			1. Gruppe (*Funks* normale Fütterung).						
a	70,00	7,534	10,763	0,688	0,987	6,846	10,229	0,11	
b	85,97	11,080	12,888	1,384	1,611	9,696	11,797	0,14	
c	49,46	3,366	6,805	0,314	0,635	3,052	6,455	0,10	
d	74,70	7,736	10,357	0,634	0,862	7,102	9,945	0,09	
Durchschnitt . .			10,203	—	1,024	—	9,607	0,11	
			2. Gruppe (gemischte Nahrungsgruppe).						
a	67,28	7,316	10,873	0,732	1,088	6,584	10,236	0,10	
b	77,13	9,292	12,048	1,328	1,722	7,964	10,801	0,17	
c	58,85	4,660	7,919	0,826	1,405	3,834	6,811	0,22	
Durchschnitt . .			10,280	—	1,405	—	9,316	0,16	
			3. Gruppe (Stärkegruppe).						
a	30,70	2,698	8,788	0,226	0,736	2,472	8,422	0,09	
b	57,96	5,830	10,059	0,970	1,674	4,860	8,771	0,19	
c	58,77	7,662	13,036	0,852	1,449	6,810	11,641	0,12	
d	45,29	5,676	12,534	0,702	1,550	4,974	11,487	0,14	
Durchschnitt . .			11,104	—	1,367	—	10,080	0,135	
			4. Gruppe (Zuckergruppe).						
a	56,53	8,206	14,519	0,912	1,613	7,294	13,496	0,12	
b	44,65	6,286	14,077	0,570	1,277	5,716	13,390	0,10	
c	60,07	5,298	8,821	0,528	0,879	4,770	7,806	0,11	
Durchschnitt . .			12,472	—	1,256	—	11,564	0,11	
			5. Gruppe (Fettgruppe).						
a	68,13	9,906	14,53	1,650	2,422	8,256	12,676	0,20	
b	41,97	5,798	13,80	0,966	2,302	4,826	12,027	0,20	
c	47,85	8,888	18,575	1,270	2,654	7,618	16,788	0,15	
d	43,79	4,324	9,873	0,721	1,646	3,603	8,606	0,20	
e	44,43	6,864	15,451	1,056	2,377	5,806	13,673	0,18	
Durchschnitt . .			14,446	—	2,280	—	12,754	0,188	
			6. Gruppe (Eiweißgruppe).						
a	54,66	2,526	4,623	0,422	0,772	2,104	4,026	0,20	
b	145,53	10,704	7,355	1,188	0,816	9,516	6,830	0,12	
c	44,28	2,136	4,826	0,236	0,533	1,900	4,488	0,12	
Durchschnitt . .			5,601	—	0,707	—	5,115	0,147	
			7. Gruppe (mit gemischter Nahrung unterernährte Gruppe).						
a	50,20	2,034	4,052	0,656	1,309	1,378	2,871	0,48	
b	29,79	1,190	3,995	0,540	1,813	0,650	2,282	0,83	
c	31,27	0,784	2,509	0,270	0,863	0,514	1,719	0,52	sterbend
d	36,32	0,854	2,353	0,168	0,462	0,686	1,976	0,24	gestorben
e	28,24	0,540	1,915	0,180	0,637	0,360	1,333	0,50	gestorben
Durchschnitt . .			2,965	—	1,019	—	2,036	0,514	

B. Gruppen mit vitaminfreier Nahrung.

Ratte	Körpergewicht (Frischsubstanz ausschl. Magen- u. Darminhalt)	Petroläther-extrakt g	Gesamtfett Proz.	Cholesterin g	Cholesterin Proz.	Hochmolekulare Fettsäure g	Neutralfett Proz.	Lipozytischer Koeffizient	Bemerkungen
8. Gruppe (gemischte Nahrungsgruppe).									
a	52,39	4,268	8,149	0,702	1,340	3,566	7,119	0,19	
b	48,85	3,138	6,424	0,550	1,126	2,588	5,542	0,21	
c	46,10	2,946	6,390	0,704	1,527	2,242	5,087	0,31	
d	30,70	1,214	3,954	0,368	1,199	0,846	2,882	0,43	
Durchschnitt . .			6,230	—	1,298	—	5,158	0,285	
9. Gruppe (Stärkegruppe).									
a	41,59	2,644	6,357	0,652	1,567	1,992	5,058	0,32	
b	35,80	2,026	5,659	0,254	0,709	1,772	5,177	0,15	
c	43,00	0,646	1,502	0,108	0,251	0,538	1,309	0,20	
Durchschnitt . .			4,506	—	0,842	—	3,848	0,223	
10. Gruppe (Zuckergruppe).									
a	54,58	1,586	2,905	0,318	0,583	1,268	2,430	0,26	
b	60,64	3,050	5,030	0,762	1,257	2,288	3,946	0,33	
c	42,05	2,728	6,489	0,388	0,923	2,340	5,821	0,17	
Durchschnitt . .			4,808	—	0,921	—	4,066	0,253	
11. Gruppe (Fettgruppe).									
a	39,60	0,312	0,785	0,058	0,146	0,253	0,669	0,23	gestorben
b	56,10	2,398	4,272	0,480	0,856	1,918	3,576	0,25	
c	31,43	1,308	4,155	0,292	0,929	1,016	3,381	0,28	
d	35,07	1,068	3,050	0,268	0,764	0,800	2,386	0,34	
Durchschnitt . .			3,066	—	0,674	—	2,503	0,275	
12. Gruppe (Eiweißgruppe).									
a	49,02	0,430	0,877	0,072	0,147	0,358	0,764	0,20	gestorben
b	41,75	1,338	3,205	0,192	0,460	1,146	2,873	0,17	
c	41,41	1,610	3,648	0,202	0,488	1,408	3,556	0,14	
Durchschnitt . .			2,577	—	0,365	—	2,398	0,170	

Dielektrizitätskonstante des alkoholhaltigen Serums.

Von

Reinhold Fürth und **Rudolf Keller.**

(Aus dem Institut für theoretische Physik der deutschen Universität in Prag.)

(Eingegangen am 14. Juli 1923.)

Mit 2 Abbildungen im Text.

In verschiedenen früheren Arbeiten[1]) wurde die vergleichsweise überraschend hohe Dielektrizitätskonstante des Serums beschrieben und mit der starken chemischen Reaktionsfähigkeit des Serums in Zusammenhang gebracht. Eine hohe Dielektrizitätskonstante — kurz Dieko — ist nach *Nernst* und *Thomson* mit einer hohen Dissoziationskonstante im Zusammenhang — nach dem Gesetz von *Walden* mit der dritten Potenz der Dieko —, und es war daher von besonderem Interesse, die Wirkung von Beimischungen zu untersuchen, welche erfahrungsgemäß die Lebensprozesse im Organismus steigern.

Als eines der Mittel von auffälligster physiologischer Wirkung schien sich ein *Campher*zusatz zu empfehlen. Die mit Campher bisher durchgeführten Versuchsreihen ergaben jedoch ein negatives Resultat. Statt der erwarteten Erhöhung trat sogar eine minimale Herabsetzung der Dieko ein, von der es jedoch noch nicht sicher ist, ob sie nicht vielleicht von dem zur Emulgierung benutzten Öle herrührt. Die Versuche wurden in der Weise gemacht, in der die Mediziner in Öl gelösten Campher verwenden, also mit sehr kleinen Mengen[2]).

Ebenso ließ ein *Coffein*zusatz, angestellt durch einen Teeabsud, keine Einwirkung auf die Dieko des Serums erkennen.

Hingegen zeigte sich bei dem Zusatz von kleinen *Alkohol*mengen eine überraschend starke Einwirkung auf die Dieko des Serums, die ihr Maximum bei etwas über $^2/_3$ Prom. Alkoholgehalt aufwies, bei dem *die Dieko um nicht weniger als 8 Proz. erhöht ist.* Dieses erstaunliche Resultat hat dazu gezwungen, die Versuchsreihe unter Anwendung besonderer Vorsicht mehreremal zu wiederholen, immer mit demselben Ergebnis. Die Elektrochemiker unter den Physiologen werden die angegebenen Quanten — Tropfenzahl von Alkohol — ein wenig roh

---

[1]) Diese Zeitschr. **115**, 134, 1921; **136**, 163, 1923.

[2]) Von einer 5proz. Campheremulsion in Öl wurde dem Serum so viel zugesetzt, daß das Serum etwa $^1/_{10}$ Prom. Campher enthielt.

finden. Die dielektrische Methode von *Drude*, beruhend auf dem maximalen Aufleuchten einer Vakuumröhre in einem gesuchten Bereich, die einzige, die sich bis jetzt hat für so leitfähige Substanzen wie etwa Serum verwenden lassen, ist aber von einer so eingeschränkten Genauigkeit, daß genauere quantitative Angaben nicht das richtige Bild der gewonnenen Ergebnisse geben würden. Nur durch eine sehr große Anzahl von Versuchen läßt sich ein Resultat verifizieren.

Um jedoch, unabhängig von der dielektrischen Analyse, ein verläßliches Bild der starken Einwirkung kleiner Alkoholmengen zu gewinnen, wurden auch *Leitfähigkeitsversuche* an demselben Objekt vorgenommen. Die Leitfähigkeit mußte, obschon infolge der hohen Dieko und der starken Verdünnung der Salze des reinen Serums schon in diesem eine ziemlich vollständige Dissoziation zu erwarten ist, infolge der stark erhöhten Dieko immer noch eine erhebliche Erhöhung erkennen lassen, diese aber mit großer Schärfe, da sich Leitfähigkeiten leicht mit beliebiger Genauigkeit messen lassen. Es ergab sich eine Erhöhung von rund 3½ Proz., etwas weniger als erwartet wurde, und das Maximum bei einem etwas höheren Alkoholzusatz (7 Prom.). Immerhin ist durch dieses Resultat eine überraschend starke Einwirkung minimaler Alkoholmengen auf diese wichtige physikalische Konstante der Körperflüssigkeit sichergestellt. Umgerechnet auf die Säfte des Menschen — Blut, Lymphe, Magensaft usw. mit rund 7 Litern veranschlagt —, tritt das dielektrische Maximum ein während des Kreislaufes der Alkoholmenge von etwa einem Glase mittelstarken Weines, das Leitfähigkeitsmaximum bei rund zehnfacher Menge, naturgemäß nur so lange, als diese Alkoholmenge unoxydiert in den Säften kreist. Dieser Zustand dürfte dem *Erregungsstadium der Alkoholeinwirkung* entsprechen. Wie aus der Kurve ersichtlich, geht die Dieko bei viel größeren Alkoholmengen stark zurück. Dies stimmt überein mit der Erfahrung, daß große Alkoholmengen, rasch zugeführt, kein Exitationsstadium erkennen lassen.

In diesem Stadium der Versuche wurde die Arbeit aus äußeren Gründen unterbrochen. Mit großem Interesse sehen wir geplanten Versuchen über die Wirkung von Thyreoidin und anderer Substanzen der inneren Sekretion entgegen, die den Stoffwechsel stark beeinflussen.

Experimenteller Teil.

Dielektrizitätskonstante.

Die zu den Messungen verwendete Versuchsanordnung und die Methodik ist in der Arbeit von *Fürth*[1]) eingehend beschrieben. Es genüge hier zu erwähnen, daß die Dieko nach der Methode von *Drude* mit elektrischen Wellen von der Wellenlänge 70 cm etwa gemessen wurde.

[1]) Ann. d. Phys. **70**, 63, 1923.

Zur Messung gelangte Rinderserum, das mit Äthylalkohol versetzt wurde. Die in den folgenden Tabellen angegebenen Alkoholmengen bezeichnen die Anzahl der Tropfen Alkohol aus einer kleinen Pipette, welcher 10 ccm Serum beigesetzt wurden. Es wurde durch eigene Versuche festgestellt, daß ein solcher Tropfen (immer aus derselben Pipette erzeugt) recht genau konstante Alkoholmengen enthielt und etwa 0,02 ccm entsprach. Die Zahlen der Tabelle geben also mit 2 multipliziert angenähert die Volumpromille Alkohol.

Es wurden im ganzen vier unabhängige Meßreihen angestellt, in jeder Meßreihe für jede Konzentration 40 Einzelmessungen vorgenommen und dann aus allen Beobachtungen das Mittel genommen. Die Dieko erhält man (s. zitierte Arbeit) aus den an dem Maßstab des *Drude*schen Apparates abgelesenen Werten durch Eichung des Apparats mit Flüssigkeiten bekannter Dieko. Solche Eichungen wurden vor, während und nach jeder Meßreihe immer wieder vorgenommen, um auf diese Weise Fehler, die durch geringfügige Veränderungen an der Apparatur zwischen den einzelnen Messungen entstehen könnten, zu eliminieren. Geeicht wurde mit Wasser, gesättigter Harnstofflösung und verschiedenen Gemischen aus Wasser und Alkohol.

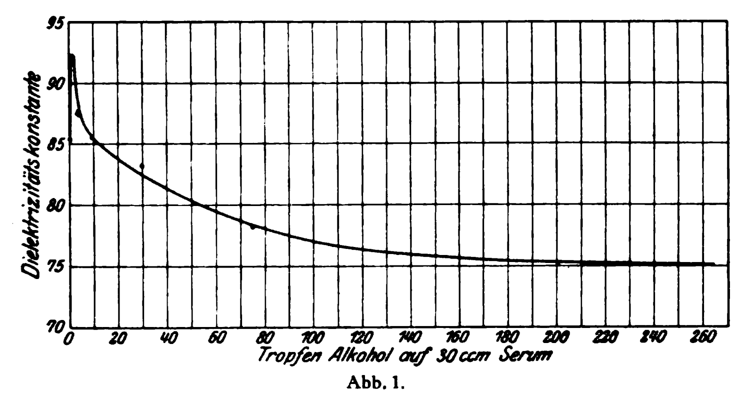


Abb. 1.

Um Autosuggestionsfehlern, die bei der empfindlichen *Drude*schen Methode leicht geschehen können, zu begegnen, wurde der Sicherheit halber bei einem Teil der Messungen so vorgegangen, daß der Beobachter am Apparat über die Konzentration, die er gerade untersuchte, in Unkenntnis gelassen wurde, während ein Mitarbeiter die Lösungen machte und die Beobachtungen notierte. Für diese Mithilfe bei den Versuchen sind wir Herrn stud. *Blüh* zu Danke verpflichtet.

Die folgende Tabelle enthält die Mittelwerte aus allen gemessenen Diekos, die noch mit einem mittleren Fehler von $\pm$ 1 behaftet sein dürften.

Tabelle I.

Alkoholmenge	Dieko	Alkoholmenge	Dieko
0	85,4	10	83,2
1,3	92,2	25	78,2
1	87,6	80	75,1
3	85,6		

Abb. 1 stellt diese Tabelle graphisch dar.

Leitfähigkeit.

Da nach der *Nernst*schen Theorie die Dissoziation eines Salzes mit der Dieko des Lösungsmittels ansteigt, lag es nahe, die Leitfähigkeit des mit Alkohol versetzten Serums auf seine Abhängigkeit von der Menge des Alkohols zu prüfen. Der Gang der Leitfähigkeit müßte, wenn das *Walden*sche Gesetz auch hier anwendbar ist, derselbe sein, wie der der Dieko, d. h. zunächst ansteigen und dann unter den normalen Wert abfallen.

Die Leitfähigkeitsmessung wurde nach der *Kohlrausch*-Methode in üblicher Weise ausgeführt. Das Meßgefäß war zylindrisch mit plattenförmigen platinierten Platinelektroden, der Meßdraht war walzenförmig, als Vergleichswiderstand diente ein Stöpselwiderstand von *Siemens*. Die Messung erfolgte mit 50periodigem Wechselstrom und Telephon in der Brücke, bei 21°C. Für jede Konzentration wurden drei Messungen angestellt, und aus ihnen das Mittel genommen. In das Meßgefäß kamen 30 ccm Rinderserum, welche sukzessive mit Äthylalkohol tropfenweise versetzt wurden. Die Tropfen wurden mit der umseitig beschriebenen Pipette erzeugt. Die Zahlen der folgenden Tabelle bedeuten die Anzahl der Tropfen auf 30 ccm Serum, stellen also mit $^2/_3$ multipliziert die Volumpromille Alkohol dar. Die in der Tabelle angegebenen Leitfähigkeiten sind relative, bezogen auf die Leitfähigkeit des reinen Serums als Einheit.

Tabelle II.

Alkohol	Leitfähigkeit	Alkohol	Leitfähigkeit	Alkohol	Leitfähigkeit
0	1,000	15	1,029	50	0,959
1	1,003	16	1,024	55	0,949
2	1,005	17	1,022	60	0,935
3	1,009	18	1,023	65	0,931
4	1,017	19	1,022	70	0,918
5	1,020	20	1,019	75	0,909
6	1,028	21	1,018	80	0,902
7	1,023	22	1,022	85	0,894
8	1,029	23	1,015	90	0,883
9	1,031	24	1,008	95	0,875
10	1,031	25	1,012	100	0,862
11	1,034	30	0,996	150	0,811
12	1,029	35	0,987	200	0,751
13	1,029	40	0,976	250	0,692
14	1,028	45	0,962		

Um aus diesen Relativwerten die Absolutwerte zu erhalten, genügt es, die Leitfähigkeit des reinen Serums absolut zu bestimmen. Zu diesem Zweck wurde die Widerstandskapazität des Gefäßes in gewohnter Weise mit einer n/50 KCl-Lösung bei 20°C bestimmt, und zwar als Mittel von fünf Messungen. Daraus und aus den Messungen an reinem Serum folgt für dessen Leitfähigkeit absolut $b = 0{,}010\,52\ \mathrm{cm}^{-1}\ \mathrm{Ohm}^{-1}$.

Abb. 2 gibt die Tabelle II graphisch wieder.

Man sieht, daß das von der *Nernst*schen Theorie geforderte Verhalten tatsächlich vorliegt, indem der Alkoholzusatz die Leitfähigkeit des Serums zunächst erhöht und dann erniedrigt. Daß das Maximum nicht an derselben Stelle wie das der Dieko liegt, ist nicht zu verwundern aus folgenden Gründen: Da die Messungen sich über einen recht langen Zeitraum erstreckten, konnte natürlich zu den verschiedenen Messungen nicht immer

das gleiche Serum verwendet werden, und auch das verwendete war nicht immer genau gleich alt. Da nun das Serum eine äußerst labile Substanz ist und geringe Veränderungen des Dispersitätsgrades usw. sicher auch auf die hier beobachteten Phänomene Einfluß haben, muß man mit diesem Grad der Übereinstimmung einstweilen zufrieden sein. Es ist ferner auch zu berücksichtigen, daß sicher der Alkoholzusatz außer der Dieko noch andere physikalische Konstanten des Serums verändert, z. B. die Viskosität, die Oberflächenspannung usw., die noch explizite auf die Leitfähigkeit Einfluß haben. Dafür spricht auch der Umstand, daß beobachtet wurde, daß Schaumblasen an der Oberfläche des Serums beim Eintropfen von einem Tropfen Alkohol in Momente des Auftreffens desselben auf die Oberfläche sofort verschwanden. Eine starke Veränderung des Serums durch das Eindringen des Alkohols soweit sie sich mit dem bloßen Auge hätte kenntlich machen müssen, wurde bis zu sehr großen Zusätzen nicht beobachtet. Erst bei den größten Alkoholzusätzen zeigte sich eine schwache Trübung.

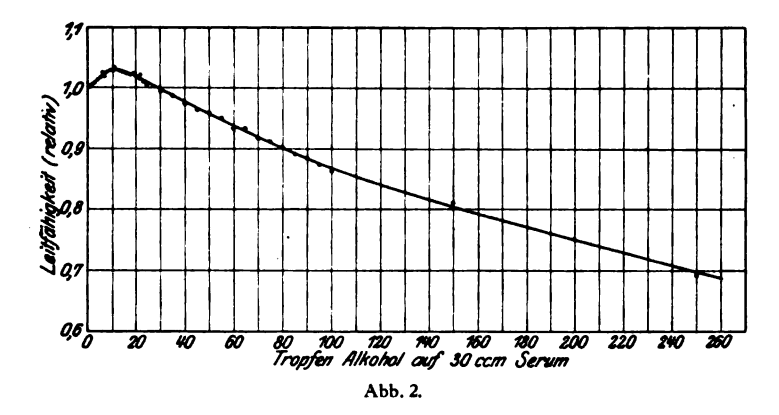


Abb. 2.

Jedenfalls wird es notwendig sein, in Zukunft außer den hier angestellten Messungen noch Messungen der Oberflächenspannung, der Viskosität usw. sowie der optischen Eigenschaften (Brechungsquotient, Drehung der Polarisationsebene usw.) vorzunehmen, sowie auch andere Zusätze, z. B. verschiedene Alkoholarten, Äther, Säuren usw., zu untersuchen, in welchem Sinne die Messungen fortgesetzt werden sollen.

Was die physikalische Erklärung des Phänomens anlangt, kann man wohl folgendes sagen: Nach der *Debye*schen Dipoltheorie sind die Moleküle eines Dielektrikums in der Regel feste sogenannte „Dipole", d. h. sie sind elektrisch neutral, die Schwerpunkte der positiven und die der negativen Ladungen fallen aber nicht zusammen, so daß sie wenigstens schematisch aufgefaßt werden können als ein Stab, an dessen einem Ende eine positive an dessen anderem Ende eine negative Ladung sitzt. Kommen diese Dipole in ein elektrisches Feld, so richten sie sich, während sie sonst ungeordnet liegen, und bringen dadurch die dielektrischen Phänomene hervor (s. übrigens die zitierte Arbeit von *Fürth*). Speziell die Aminosäuren, die jedenfalls eine elektronegative Amidogruppe und eine positive Säuregruppe enthalten, sind sicher starke Dipole. Ihr Moment wird aber in hohem Grade von der Größe der Molekülkomplexe und von den Stellen abhängen, an denen die positiven und negativen Ladungen hängen. Gerade bei so komplizierten

und labilen Körpern wie bei den Serumalbuminen kann der Alkoholzusatz sehr leicht eine Umlagerung hervorrufen, die die beobachteten Änderungen von Dieko und Leitfähigkeit verschuldet. Im einzelnen diese Einwirkung zu verfolgen, scheint allerdings derzeit aussichtslos.

Wir verweisen hier im übrigen auf eine demnächst in der Zeitschr. f. phys. Chem. erscheinende Abhandlung von *O. Blüh*, der bei einer Reihe von amphoteren Stoffen die Diekos in Abhängigkeit von der Konzentration in wässerigen Lösungen untersucht und theoretisch nach der Dipoltheorie diskutiert hat.

Zusammenfassung.

Kleine, gerade noch physiologisch wirksame Alkoholmengen erhöhen in überraschend starker Weise die Dielektrizitätskonstante, die elektrolytische Leitfähigkeit und die chemische Reaktionsfähigkeit des Serums.

Beiträge zur Kenntnis der Stickstoffverbindungen des Magerkäses.

Von

E. Winterstein und O. Huppert.

Aus dem agrikulturchemischen Laboratorium der Eidgenössischen Technischen Hochschule in Zürich.)

(Eingegangen am 14. Juli 1923.)

Eine systematische chemische Käseforschung besteht erst seit 1880, dem Jahre, in dem Untersuchungen über die chemische Zusammensetzung des Käses und über den Prozeß der Reifung im agrikulturchemischen Laboratorium der Eidgenössischen Technischen Hochschule Zürich begannen.

Auf die hinlänglich bekannten Arbeiten von *M. Weidmann*[1]), *E. Schulze*[2]), *B. Roese*[3]), *F. Bennecke*[4]) *Cohn*[5]) und *Drechsel*[6]) sei einleitend hingewiesen. Diese Forscher beschäftigten sich vorwiegend mit den Spaltungsprodukten des Eiweißes, und die Züricher Forscher, von *Weidmann* an, hatten übereinstimmend festgestellt, daß noch Eiweißbausteine vorhanden sein müßten, die sie nicht zu finden vermochten. *E. Winterstein* und *J. Thöni*[7]) fanden die beiden Basen Lysin und Histidin, die auch *Steinegger* in den Salzsteinen des Käses fand.

Zwei Jahre später erschien die zweite Veröffentlichung *Wintersteins*[8]). Folgendes sind die Ergebnisse dieser wertvollen Untersuchungen, welche die Kenntnis von der Zusammensetzung des Käses um ein wesentliches Stück weiter brachten.

An primären Spaltungsprodukten der in der frischen Käsemasse enthaltenen Eiweißstoffe wurden nachgewiesen: Glykokoll, Alanin, Aminovaleriansäure, Leucin, Pyrrolidincarbonsäure, Asparaginsäure, Glutaminsäure, Tryptophan, Histidin und Lysin. Im wässerigen Käseextrakt fand *Winterstein* zwei Arten von eiweißartigen Abbauprodukten, von denen die erste, von ihm Tyroalbumin genannt, durch Aufkochen der angesäuerten

---

1) Landwirtschaftl. Jahrb. 1882, S. 587.
2) Landwirtschaftl. Versuchsstation 1884, S. 115.
3) Zentralbl. f. Agrikulturchemie 1885, S. 266.
4) Milchw. Zentralbl. 1887, S. 591.
5) Beiträge zur Biologie der Pflanzen 1875, S. 3.
6) Arch. f. Phys. 1891, S. 248.
7) Zeitschr. f. phys. Chem. **36**, 28, 1902.
8) Ebendaselbst **41**, 485, 1904.

Lösung abgeschieden wurde. Im Filtrat von Tyroalbumin wurde die zweite Art mit Bleiessig ausgefällt. Sie hatte peptonartigen Charakter. Die nach Beseitigung des Bleis und Umfällen mit Phosphorwolframsäure dargestellten reinen Peptone ließen sich in einen in Alkohol löslichen und einen darin unlöslichen Teil trennen. In gereiftem Käse wurden Nucleinbasen und Cholin gefunden. An stickstofffreien Bestandteilen des Käses wurden außer der Milchsäure nachgewiesen: Bernsteinsäure und Citronensäure.

In seiner dritten Mitteilung[1]) ergänzt *Winterstein* zusammen mit seinem Schüler *Bissegger* die Liste der Aminosäuren durch das Auffinden von Isoleucin und Oxypyrrolidincarbonsäure. Ein 8 Monate alter Emmentaler Käse wird quantitativ untersucht auf Gesamtstickstoff, Gesamteiweißstickstoff, Stickstoff im Tyroalbumin, Peptonstickstoff, Basenstickstoff, Ammoniakstickstoff, Stickstoff im wässerigen Extrakt, wasserlösliche Substanz, Caseoglutinstickstoff und Aminosäurestickstoff. Das große Käsestück, von dem die Untersuchungsprobe entnommen worden war, wurde im Käsekeller drei weitere Monate lang liegengelassen, und der 11 Monate alte Käse dann auf die gleiche Weise untersucht. In bezug auf die Stickstoffverbindungen wichen die beiden Käseproben nur wenig voneinander ab. Daraus war zu schließen, daß die Bildung der kristallinischen Spaltungsprodukte aus dem Paracasein wenigstens bei diesem Käse in der ersten Zeit der Reifung erfolgt. Beim längeren Lagern scheinen dagegen die sekundären Prozesse in den Vordergrund zu treten, denn man findet eine beträchtliche Vermehrung des Ammoniakstickstoffs, ohne daß die Menge des Basenstickstoffs eine nennenswerte Veränderung erlitte. Wie unsere jetzigen Untersuchungen zeigen werden, kommt diesen Erscheinungen eine allgemeine Gültigkeit nicht zu. Die beiden Forscher stellten weiter fest, daß in normalem Emmentaler Käse keine durch sekundäre Prozesse entstehende Fäulnisbasen vorhanden sind. Die aufgefundenen Mengen des Phenylalanins und der α-Pyrrolidincarbonsäure entsprechen ungefähr der Menge des zersetzten Paracaseins. Arginin findet sich nicht vor. Der Käsereifungsprozeß ist somit ein Vorgang, bei welchem das Paracasein einer Spaltung in eine Reihe von Eiweißkörpern und kristallinischen Spaltungsprodukten unterliegt. Dabei werden die Glutaminsäure und das Tyrosin zum größten Teil, etwa entstandenes Arginin dagegen vollständig weiter gespalten.

In seiner vierten Mitteilung im Jahre 1909 berichtet *Winterstein*[2]) über das Auftreten von kleinen Mengen von Paraoxyphenyläthylamin in einem reifen abnormen Emmentaler Käse und in der fünften Mitteilung 1919[3]) geht der gleiche Forscher der Frage nach, wie man sich die Abwesenheit des Arginins als des einzigen bis jetzt bekannten Eiweißspaltungsproduktes, das bis dahin im reifen Käse nicht gefunden wurde, zu erklären hat. Da im Käse nur kleine Mengen von Ammonsalzen vorhanden sind, welche aus dem Arginin über den Harnstoff entstehen können, so war festzustellen, wie das Arginin, das anfangs fraglos vorhanden ist, bei der Käsereifung weiter zerfällt. Als Zerfallprodukte in Betracht kommen außer dem Ammoniak: Agmatin, 1-4-Diaminobutan, Ornithin und Harnstoff. Das 1-4-Diaminobutan konnte nicht aufgefunden werden, dagegen gelang es *O. Winterstein* nach dem von *R. Fosse* (Ann. de l'inst. Pasteur. **30**, 525,

[1]) Zeitschr. f. phys. Chem. **47**, 28, 1905.
[2]) Ebendaselbst **59**, 138, 1909.
[3]) Ebendaselbst **105**, 25, 1919.

1916) angegebenen Verfahren mit Xanthydrol Harnstoff in einem Zentrifugenmagerkäse nachzuweisen. Auch Ornithin wurde in demselben Magerkäse gefunden und nach den Angaben von *A. Kossel* und *Weiss* (Zeitschr. f. phys. Chem. **68**, 160, 1910) identifiziert. Neben diesen beiden Spaltungsprodukten enthielt der Käse Spuren von Paraoxyphenyläthylamin. Auch Agmatin schien vorhanden zu sein.

Etwa von der Mitte bis gegen Ende des vorigen Jahrhunderts galt die *Voit-Pettenkofer*sche Lehre von der Umwandlung von Eiweiß in Fett im Tierkörper fast für unangreifbar. Unter anderem wurde als Beweis immer wieder die vermeintliche Vermehrung des Fettes beim Reifen des Käses angeführt. Aber längst bevor die berühmte Kritik *Eduard Pflügers* (Pflügers Arch. 1891, S. 330) erschien, kam man auf dem Gebiete der Käseforschung zu ganz widersprechenden Ergebnissen in dieser Frage. Während *Blondeau*[1]) als erster die Bildung von Fett aus Eiweiß bei der Käsereifung einwandfrei glaubte festgestellt zu haben, kam später *Duclaux*[2]) auf Grund seiner Untersuchungen zu dem Schlusse, daß keine wesentliche Veränderung des Fettgehaltes stattfände. *Brassier*[3]) dagegen fand sogar eine wesentliche Abnahme des Fettes bei der Reifung des Käses. *Schulze* hat in seiner großen grundlegenden Arbeit[4]) festgestellt, daß keine wesentlichen Veränderungen des Fettgehaltes bei der Käsereifung eintreten. Seitdem beschäftigten sich eine Reihe von Forschern mit der Frage, doch seit jener Kritik *Pflügers* mehrten sich die Stimmen, welche eine Fettbildung aus Eiweiß bezweifelten. Dennoch wollte der Streit noch nicht endigen. 1893 untersuchte *Jakobsthal*[5]) auf Veranlassung *Pflügers* einen Käse auf seinen Fettgehalt während der Reifung, kam aber zu einem für die Ansicht *Pflügers* ungünstigen Ergebnis, da sich in der Tat beim Reifungsprozeß Fett neu zu bilden schien. Einen Ausweg, um dem Widerspruch gegen die Theorie *Pflügers* zu begegnen, fand *Jakobsthal* dadurch, daß er die Fettbildung lediglich der synthetischen Kraft der Schimmelpilze des Käses zuschrieb, deren massenhafte Ansammlung, und zwar schon zu Beginn der Reifung er feststellte. Nun fanden aber neuerdings *Kumagava* und *Otha*[6]), daß die Schimmelpilze in hohem Grade die Fähigkeit besitzen, Fett aufzuzehren, und daß sie unmöglich die Ursache der vermeintlichen Vermehrung des Fettgehalts bei der Käsereifung sein können. Im Jahre 1914 erschien eine sehr eingehende Arbeit, auf Veranlassung von *M. Kumagava* von *Kura Kondo*[7]) ausgeführt, welche geeignet sein dürfte, die Frage nach der Fettbildung aus Eiweiß bei der Reifung des Käses endgültig zu klären. *Kondo* bediente sich zur Fettbestimmung der Verseifungsmethode von *Kumagava-Suto* (diese Zeitschr. 8, 272, 1908). Er fand zunächst einmal bei allen untersuchten Proben eine Abnahme des Fettgehalts bei der Reifung und damit Hand in Hand gehend eine starke Entwicklung von Schimmelpilzen. Um deren Wirkung auszuschalten, überzog *Kondo* den Käse vor Beginn der Reifung mit Paraffin. Es zeigte sich aber, daß hinsichtlich der Fettabnahme des Käses bei der Reifung an der Luft mit oder ohne Paraffinüberzug kein

---

1) Ann. chim. Phys. 1864, S. 208.
2) C. r. 1877.
3) Zeitschr. f. prakt. Chem. **2**, 21, 203.
4) Landwirtschaftl. Versuchsstation 1884, S. 115.
5) Anh. f. d. ges. Path. u. Phys. 1893, S. 484.
6) Diese Zeitschr. **31**, 177, 1911.
7) Ebendaselbst **69**, 113, 1914.

merklicher Unterschied vorhanden war. Augenscheinlich gelangt die Luft durch die dünne Paraffinhaut doch zu den Pilzkeimen, so daß sich diese entwickeln können. Um die Luft ganz auszuschalten und damit das Wachstum der Aeroben auszuschließen, wurde nunmehr der unreife Käse in einem mit Kohlensäure angefüllten Raume aufbewahrt. Jetzt nahm der Fettgehalt weder zu noch ab, obgleich, wie durch ausgedehnte Versuche dargelegt wurde, die Reifung des Käses trotz Ausschaltung der Luft den normalen Verlauf zeigte. Um die Richtigkeit dieses Befundes nachzuprüfen, wurde Käse in Wasserstoffgas zur Reifung gebracht. Das Ergebnis war das gleiche. Schaltet man die Aeroben also während der Reifungszeit aus, so nimmt, nach *Kondo*, der Fettgehalt weder zu noch ab, und die Aeroben selbst wären demnach für den Reifungsprozeß entbehrlich. *Kondo* wirft dann noch die Frage auf, ob nun durch die Anaeroben oder vielmehr durch die im Käse präexistierenden Fermente allein der Prozeß der Reifung vor sich geht. Auf alle Fälle dürften die Versuche erwiesen haben, daß von einer Neubildung des Fettes aus Eiweiß bei der Käsereifung keine Rede sein kann. Wie *Kondo* zugibt, kann der Ätherextrakt sehr wohl zunehmen, allein schon wegen des Auftretens von Milchsäure und anderen organischen Substanzen. Dem Teile der *Kondo*schen Arbeit, der sich mit dem Studium des Reifungsprozesses als solchem beschäftigt, dürfte deshalb Allgemeingültigkeit nicht zukommen, weil nach unseren Erfahrungen die chemisch-biologischen Veränderungen in kleinen Käsestücken anders verlaufen als im großen.

Fast zu gleicher Zeit mit der *Kondo*schen Arbeit erschien eine Veröffentlichung von *W. D. Kooper*[1]) über Käsereifung, in der auch die Frage nach dem Verhalten des Fettes behandelt wird. *Kooper* schreibt: „Während sich beim Frühstückskäse das Verhältnis zwischen Fett und Nichtfett der Trockenmasse zugunsten des ersteren verschoben hat, fand beim Camembert das Umgekehrte statt, oder mit anderen Worten: Im „Frühstückskäse" herrschten solche Bakterien vor, die vorwiegend die Eiweißkörper angreifen, während beim Camembert jedenfalls solche Organismen die Oberhand hatten, welche eine hydrolytische Spaltung des Fettes herbeiführen können. Daß beim Frühstückskäse eine Zunahme des Fettes auf Kosten der Proteinstoffe unter Mitwirkung gewisser Kleinlebewesen vor sich ging, dürfte weniger wahrscheinlich sein". Für uns ist in der *Kooper*schen Arbeit die Feststellung von besonderem Interesse, daß sowohl bei dem von ihm untersuchten Frühstückskäse, als auch beim Camembert der Ammoniakgehalt mit steigendem Alter zunimmt. Wir werden später bei Besprechung unserer eigenen Versuche auf diese Erscheinung zurückkommen.

Die amerikanischen Forscher *Slyke* und *Hart*[2]) nehmen an, daß im Cheddarkäse die Reifung damit beginnt, daß die aus dem Milchzucker gebildete Milchsäure sich mit dem Paracasein zu einem Salze verbindet, das in Wasser unlöslich, dagegen in 5proz. Salzwasser und auch in 50proz. Alkohol löslich ist. In 24 Stunden altem Cheddarkäse waren 40 bis 70 Proz. des Stickstoffs in Salzwasser löslich, in Wasser dagegen nur 6 Proz. Das Verhältnis wurde dann mit zunehmender Reifung fortwährend anders, insofern nämlich die Löslichkeit in Salzwasser abnahm und die in Wasser zunahm. Nach 9 Monaten waren nur 13 Proz. des Stickstoffs in Salzwasser löslich, gegen 53 Proz. in Wasser. *O. Jensen*[3]) wirft die Frage auf, ob etwa

---

[1]) Zeitschr. f. Unters. d. Nahrungs- und Genußm. 1914, S. 322.

[2]) Zeitschr. f. Agr.-Chem. 1905, S. 236.

[3]) Zentralbl. f. Bakt. **32**, 202. 1912.

auch im Emmentaler Käse milchsaures Paracasein in merkbarer Menge entstehen könnte. Er hält es für nicht wahrscheinlich, „weil die Milchsäuremengen, die im Emmentaler Käse entstehen, nicht einmal ausreichen, um den Kalk des Paracaseins zu binden und die tertiären und sekundären Phosphate in primäre überzuführen.

So umfangreich auch die Käseliteratur ist, mit der eigentlichen Käseanalyse, besonders soweit sie Eiweißspaltungsprodukte während der Käsereifung angeht, haben sich außer den erwähnten Züricher Forschern verhältnismäßig wenige beschäftigt, unter ihnen *Stefan Bondzynski*, *Olaf*, *Jensen* und *v. Gratz*. Letzterer versucht[1]) die Proteolyse im Käse durch Titrierung mit Formol nach einer Methode zu verfolgen, wie sie 1908 von *L. Sörensen* (Enzymmethoden, diese Zeitschr. 7, 45) angegeben worden ist. *Gratz* kommt zu dem Schlusse, daß gewisse, in jedem Käse vorhandene Eiweißkörper, wie Tyrosin, Guanidin, α-Prolin u. a., „schlechte Werte gebende Substanzen" sind. Er glaubt aber, das Verfahren seiner Einfachheit wegen trotzdem empfehlen zu sollen. „Die Zahlen unserer Tabelle", sagt *Gratz*, „weisen ja unzweideutig darauf hin, daß sich durch die Formoltitrierung ein ähnlicher Einblick in die Tiefe der Proteolyse im Käse gewinnen läßt wie durch die Fällungsmethoden. Jedenfalls ergänzen die beiden Methoden einander. Wir sahen bei unserer Arbeit von der Formoltitrierung ab, zumal das Verfahren zurzeit von anderer Seite angewendet und nachgeprüft wird.

Einen weiteren Beitrag zur Käseanalyse, nur zum Teil von den Arbeiten der Züricher Forscher ausgehend, lieferten 1904 *O. Jensen*[2]) und zwei Jahre später *O. Jensen* und *E. Plattner*[3]). Sie legen zur Charakterisierung des Reifungsvorganges auf folgende Angaben besonderes Gewicht: 1. Säuregehalt der Käsemasse und Verhältnis zwischen Stickstoff und Kalk; 2. Menge und Natur der flüchtigen Fettsäuren; 3. Größe der Fettspaltung; 4. Menge des Stickstoffs der wasserlöslichen Proteinstoffe, der Monaminsäuren, der organischen Basen und des Ammoniaks. Auf die zahlreichen anderen grundlegenden Arbeiten *Jensens* vermögen wir im Rahmen dieser Arbeit nicht einzugehen.

Trillat und *Sauton*[4]) glauben, daß Geruch und Geschmack der Käse zum Teil durch die Gegenwart von Aldehyden beeinflußt werden, die in Form von Acetaten durch besondere Hefearten aus dem Milchzucker entstehen. Sie destillierten 200 g Käse mit 1proz. Schwefelsäure und bestimmten im Destillat den Aldehydgehalt kolorimetrisch mit fuchsinschwefliger Säure. Die beiden Forscher fanden, daß z. B. im Brie 12 mg auf 1000 g Käse, im Emmentaler Spuren von Aldehyden vorhanden sind, dagegen enthielt Milch kein Aldehyd. Wir kommen in unserer Arbeit auf die Versuche zurück.

Großen Einfluß auf den Geschmack eines Käses haben vor allem die Aminosäuren. Aber auch Art und Menge der organischen Säuren sind von Bedeutung. *M. A. Blanchetière*[5]) untersucht die Beziehungen zwischen der chemischen Konstitution gewisser Derivate der Aminosäuren — insbesondere der aus Asparagin entstehenden Bernsteinsäure — und dem

---

[1]) Zeitschr. f. Unters. d. Nahrungs- und Genußm. 1912, S. 379.

[2]) Landw. Jahrb. d. Schweiz 1904, S. 320.

[3]) Ebendaselbst 1906.

[4]) C. r. 1907, S. 333.

[5]) Ebendaselbst **168**, 206, 1909.

Verhalten gegenüber Bakterien. Mit dem bact. fluorescens liquefaciens erhielt er aus Asparagin 80 Proz. der Theorie an Bernsteinsäure, wobei als Zwischenprodukt Äpfelsäure auftritt. *Emmerling* und *Reiser* (Deutsch. chem. Ges. 35, 700, 1902) stellten die Bildung von Fumarsäure fest bei Gegenwart des genannten Bakteriums, fanden aber keine Bernsteinsäure. Es ist anzunehmen, daß auch andere Bakterien die Bildung organischer Säuren aus den stickstoffhaltigen Eiweißzersetzungsprodukten der Käse herbeiführen, und diese mehr oder weniger zufälligen Nebenreaktionen beeinflussen natürlich die Käsereifung und besonders den Geschmack.

Jensen[1]) schreibt den flüchtigen Fettsäuren, von denen besonders Buttersäure und Capronsäure in verhältnismäßig großer Menge vorhanden sind, eine besondere Bedeutung für den Geschmack der Käse zu. Auf *Jensens* eingehende „Studien über die flüchtigen Fettsäuren im Käse“[2]) sei an dieser Stelle besonders hingewiesen.

Die Erkenntnis von der Bedeutung der Milchsäurebakterien für die Käsereifung führten zu den ausgedehnten, erfolgreichen Versuchen, die *Burri*, *Allemann* und *Kürsteiner* mit „Käsereinkulturen“ in der schweizerischen milchwirtschaftlichen und bakteriologischen Anstalt Bern-Liebefeld anstellten.

Zum Studium der Vorgänge bei der Proteolyse des Käses wäre es vielleicht angebracht, auf Paracasein bei verschiedenen Temperaturen, verschiedenem Fettgehalt und anderen verschiedenartigen Versuchsbedingungen Reinkulturen gewisser Bakterien einwirken zu lassen.

Auf die zahlreichen anderen Arbeiten auf dem Gebiete der Käseforschung, besonders die von *Burri*, *Peter*, *Stutzer*, *v. Freudenreich*, *Allemann*, *Slyke*, und *Hart*, *Koestler*, *Kürsteiner*, *Edelbacher* sei an dieser Stelle hingewiesen.

Trotz vieler wertvoller Arbeit und zunehmendem Wissen auf dem Gebiete der Chemie des Käses kennen wir verhältnismäßig wenig von den chemischen Vorgängen. Wir wissen auch heute noch nicht, wie die Bildung des Paracaseins zu verstehen ist, ob es sich um eine Abspaltung, eine Umwandlung, eine Hydrolyse oder einen anderen Prozeß handelt. Auch der Vorgang der Labwirkung ist im einzelnen weder nach der chemischen noch nach der physiologischen Seite hin völlig geklärt. In nachfolgendem wird versucht, eine Anzahl ungelöster Fragen auf dem Gebiete aufzuwerfen.

Casein mit Lab gespalten in: Molkeneiweiß. Quantitative Bestimmung desselben. Genaue Charakteristik der physikalischen und chemischen Eigenschaften dieser Eiweißsubstanz. — Bestimmung der bei der Hydrolyse auftretenden Basen und Aminosäuren.
Paracasein: wie beim Molkeneiweiß.

Daraus ergäbe sich, wieweit sich das Paracasein vom Casein unterscheidet. Verhalten des Paracaseins zu den Labfermenten und den einzelnen Bakterien des Käses. — Nähere Untersuchung über die

[1]) Landw. Jahrb. d. Schweiz 1906, S. 320.
[2]) Dissert. Rosenhagen 1904.

Entstehung und die physikalischen und chemischen Eigenschaften der alkohollöslichen Eiweißkörper, des sogenannten Caseoglutins, der wasserlöslichen Albumosen und Polypeptide des in Wasser unlöslichen Rückstandes, des sogenannten Tyrocaseins.

Feststellung der Mengen der einzelnen kristallinischen Spaltungsprodukte, Aminosäuren und Basen. — Die Harnstoff- und Ammoniakbildung. Die Entstehung und die Mengen der sekundären Produkte. — Die Bedeutung der Fette. Das Verhalten der Phosphorsäure und die Beziehungen zum Kalk und zu den unlöslichen Eiweißkörpern des Käses.

Bedenkt man weiter, daß der Prozeß der Käsereifung kein rein chemischer bzw. chemisch-physikalischer, sondern ein biologischer ist, und daß jeder Käse gleichsam ein Individuum darstellt, so zeigt sich der Umfang des noch zu Erforschenden und die Schwierigkeit des ganzen Forschungsgebietes.

So vermag denn auch diese Arbeit nur einen bescheidenen Beitrag zu dem in der Käsechemie Erreichten zu leisten. Die bis jetzt vorgenommenen Untersuchungen erstrecken sich fast nur auf die edleren Käsesorten, besonders auf den Emmentaler Fettkäse. Daher wurde der Magerkäse zum Hauptgegenstand vorliegender Untersuchung gemacht.

Der Hauptbestandteil der frischen Käsemasse ist der Paracaseinkalk. Da er in Wasser unlöslich ist, so sind frische Käse sehr wenig schmackhaft. Nach *Jensen* und *Plattner* beträgt die Menge des Stickstoffs der löslichen Eiweißsubstanz des ausfallenden Gerinnsels nur 0,5 Proz. des Gesamtstickstoffs. In der fertig gebildeten frischen Käsemasse sind bereits 5 Proz. löslichen Stickstoffs, und im reifen Emmentaler Käse ist wesentlich mehr als ein Viertel des Gesamtstickstoffs in wasserlöslicher organischer Substanz vorhanden. Es wäre zu untersuchen, wie sich im Vergleich dazu die Menge des sogenannten wasserlöslichen Stickstoffs in den Magerkäsen verhält.

Die zunehmende Schmackhaftigkeit des Käses wird natürlich nicht nur durch die zunehmende Wasserlöslichkeit, sondern auch durch Art und Menge der Spaltungsprodukte bewirkt. Alle bis jetzt untersuchten Emmentaler Fettkäse ergaben eine verhältnismäßig große Menge von Eiweißzersetzungsprodukten, insbesondere von Aminosäuren. Die Ergebnisse der Untersuchung einiger Magerkäse schienen darauf schließen zu lassen, daß die Menge der Zersetzungsprodukte geringer ist. Es ist daher von Interesse, einmal eine größere Menge von Magerkäsen zu untersuchen, und zwar mit wechselndem Fettgehalt, um zunächst einmal zu prüfen, ob grundsätzlich in allen Magerkäsen die Eiweißzersetzung geringer ist, und dann weiterhin

festzustellen, ob etwa der Fettgehalt mit der Zersetzung der Eiweißsubstanzen in irgend einem Zusammenhang steht.

Nach diesen quantitativen Untersuchungen wäre zu prüfen, ob und bis zu welchem Grade sich die Eiweißspaltungsprodukte, welche *Winterstein* und seine Mitarbeiter im Emmentaler Fettkäse vorfanden, auch in den Magerkäsen befinden. Auf dem Wege zu diesem Hauptziel ergeben sich von selbst einige Nebenarbeiten.

I. Quantitative Bestimmungen.

A. Die Methoden.

Zur Bestimmung des Wassers wurde die zerkleinerte Käsemasse nicht, wie sonst üblich, bei 100 bis 120°, sondern, nach 24stündigem Stehen im Exsikkator, nur bei 50° bis zu annähernder Gewichtskonstanz getrocknet. Durch diese Methode der Wasserbestimmung wird allerdings das Gesamtbild der Zusammensetzung der Käse etwas anders, als wenn man bei 100° und darüber trocknet, denn die letzten Reste des Wassers werden natürlich bei 50° nicht verdampft. Auch bei einer Trockentemperatur von nur 50° läßt sich allerdings ein Ammoniakverlust nicht ganz vermeiden. Wir fanden in Übereinstimmung mit *Jensen* und *Plattner*[1]) stets in frischem Käse etwas mehr Ammoniak als in dem getrockneten (noch fetthaltigen), auf feuchten Käse umgerechnet. Zur Bestimmung von Asche, Ätherextrakt, Gesamtstickstoff (*Kjeldahl*), Gesamteiweißstickstoff (*Stutzer*) wandten wir die üblichen, hinlänglich bekannten Methoden an.

Zur Prüfung der *Stutzer*schen Methode auf ihre Genauigkeit wurde bei einigen Käsen eine Kontrolle der Gesamteiweißstickstoffbestimmung mit dem *Brücke*schen Reagens in salzsaurer Lösung vorgenommen.

Bestimmung des Gesamt-Eiweißstickstoffs.

	Nach *Stutzer* Proz.	Mit *Brückes* Reagens Proz.
Magerkäse 2	9,45	9,36
„ 7	8,52	8,33
Emmentaler Fettkäse .	9,09	9,26

Die Zahlen zeigen verhältnismäßig gute Übereinstimmung. Auf einen Vergleich der *Stutzer*schen mit der Bleiessigmethode soll später bei Besprechung des Verfahrens zur Bestimmung der Peptone zurückgekommen werden.

Basen und Aminosäuren.

Nach Ausfällung des Gesamteiweißstickstoffs wurden alle Eiweißspaltungsprodukte primärer und sekundärer Art in einem, durch Phosphorwolframsäure erzeugten Niederschlage vereinigt. Er enthält insbesondere auch den Rest der etwa nicht in den Kupferhydroxydniederschlag eingegangenen Peptone, sowie das Ammoniak. Letzteres wurde dann in einer besonderen Käseprobe für sich bestimmt, sein Stickstoff von dem Stickstoff des Phosphorwolframniederschlages abgezogen und der Rest als Stickstoff

[1]) Landwirtschaftl. Jahrb. der Schweiz 1906.

der organischen Basen in Rechnung gestellt[1]). Wir verfuhren folgendermaßen:

Das Filtrat des Kupferhydroxydniederschlages wurde nach dem Ansäuren mit einigen Tropfen Schwefelsäure auf etwa 50 ccm eingedampft, mit 2 ccm konzentrierter Schwefelsäure und mit 5 ccm einer 5proz. Phosphorwolframsäure versetzt und 12 Stunden stehengelassen. Dann wurde, wie bei allen derartigen Stickstoffbestimmungen, durch ein aschenfreies Filter abgegossen, mit 5proz. Schwefelsäure ausgewaschen und der Stickstoff nach *Kjeldahl* bestimmt. Erhitzt man in den zwei ersten Stunden nur langsam, so läßt sich das lästige Stoßen vermeiden, ohne daß man, nach dem Vorschlage *Bisseggers*, eine vermehrte Menge von Kupfersulfat zusetzt, das bei allen Stickstoffverbindungen von uns als Katalyt verwendet wurde. Hat man zu viel Salze in der Schwefelsäure, so läßt sich der Inhalt des Kjeldahlkolbens nach erfolgter Oxydation nur schwer herausbringen. Auch die Stickstoffbestimmungen im Phosphorwolframsäureniederschlag gaben gut übereinstimmende Zahlen.

Den Betrag für den Aminosäurestickstoff erhält man aus der Differenz der Summe von Basen- und Eiweißstickstoff vom Gesamtstickstoff. Bei einer Anzahl von Käsen wurde zur Kontrolle der Stickstoff der Aminosäuren im Filtrat vom Phosphorwolframsäureniederschlag bestimmt. Die Differenzen der zwei Parallelbestimmungen überstiegen nicht den Betrag von 0,30 Proz., waren aber meist erheblich geringer. Aus diesen Untersuchungen sowie auch aus den in den Tabellen zusammengestellten Zahlen geht hervor, daß die soeben angeführten Untersuchungsmethoden zur quantitativen Bestimmung von Eiweißstickstoff, Stickstoff der Basen bzw. gewisser Polypeptide und der Monoaminosäuren durchaus vergleichbare Ergebnisse liefern.

Ammoniak.

Über die Bestimmung von Ammoniak in organischen Stoffen, wie z. B. in pflanzlichen Organen, im Weine, in der Ackererde sind besonders innerhalb der letzten zwei Jahrzehnte eine Reihe von Veröffentlichungen erschienen.

Die vorgeschlagenen Methoden lassen sich in drei Gruppen einteilen: 1. Sieden mit Alkalien; 2. Sieden mit schwachen Alkalien und Trennung des Ammoniums von anderen basischen Stoffen zwecks besonderer Bestimmung; 3. Destillation im luftverdünnten Raume mit Magnesiumoxyd oder Bariumcarbonat. Das erste Verfahren hat sich seit langem als unbrauchbar erwiesen, obgleich es insbesondere von einigen französischen und italienischen Forschern bis in die Neuzeit hinein empfohlen wird (vgl. *G. Paris*, Studio chimico del grappolo d'uva, del mosto, del vino ecc., 1913, S. 162 und *J. Laborde*, Vins 1912, S. 155). Beim Sieden mit Alkali gehen nämlich außer Ammoniak auch andere basische Stoffe über, und wenn man bis zur Trockne verdampft und abermals Wasser und Alkali zusetzt, so geht beim Kochen die Entwicklung von Basen immer weiter.

Die Hauptmenge basischer Stoffe geht allerdings während der ersten halben Stunde der Destillation über, und man hat daher schon ein praktisch

[1]) Wie bereits erwähnt wurde und wie auch aus den qualitativen Untersuchungen hervorgeht, gehen in den Phosphorwolframsäureniederschlag nicht nur die Basen, sondern auch gewisse Polypeptide ein, die durch Kupferhydroxyd nicht gefällt werden, so z. B.: l-Leucyl-d-l-phenylalanin, ferner Monoglycyl-l-Cystin (vgl. *Abderhalden*, Biochem. Handb. 4, 291, Berlin 1911).

brauchbares Verfahren, wenn es gelingt, im Destillat das Ammoniak von den anderen Basen zu trennen. *Gautier* und *Halphen* (C. r. **136**, 1373, 1903) schlugen daher vor, das Ammoniak im Destillat durch Platinchlorid von den anderen basischen Stoffen zu trennen. Da aber auch organische Basen mit Platinchlorid unlösliche Doppelsalze bilden, so ist dieses Verfahren ungenau. Eine brauchbare Methode, um im Destillat die flüchtigen organischen Basen von dem Ammoniak zu trennen, hat *A. Beyer* ausgearbeitet (Chem.-Ztg. **27**, 809, 1903), das von *Tillmann*, *Splittgerber* und *Riffar* insbesondere auch zur Bestimmung des Ammoniaks in der Milch angewendet wurde (Zeitschr. f. Unters. d. Nahrungs- u. Genußm. **27**, 59—76, 1914). Danach wird das Ammoniak als Ammoniummagnesiumphosphat von den übrigen Basen des Destillates getrennt. *Baragiola* und *Godet* (Zeitschr. f. Unters. d. Nahrungs- u. Genußm. **30**, 169, 1915) prüften das *Beyer*sche Verfahren nach und bestätigten an der Hand zahlreicher Belege seine Richtigkeit.

Winterstein und *Schulze* (Handb. d. biochem. Arbeitsmeth. **2**, 522) und andere Forscher empfehlen die Destillation mit Magnesiumoxyd im Vakuum bei 40°. Dabei geht, wie *Bissegger* und *Winterstein* bestätigten[1], keine Spur von Ammoniak mehr über, wenn man nach erfolgter Destillation zur Trockne von neuem destilliert. *Baragiola* und *Schuppli* (Zeitschr. f. Unters. d. Nahrungs- u. Genußm. **32**, 441, 1916 und Landwirtschaftl. Versuchsstat. 1917, S. 123) stellen fest, daß bei der Destillation von organischen Stoffen, insbesondere von Gülle, Ackererde und Wein mit Magnesiumoxyd im Vakuum bei 40° in der Tat nur bereits vorgebildetes Ammoniak überdestilliert und höchstens Spuren von organischen Basen. Bei der Prüfung des *Beyer*schen Verfahrens fanden sie, daß nur dann das Ammoniak als Ammoniummagnesiumphosphat ausfällt, wenn für einen beträchtlichen Überschuß von Phosphorsäureion gesorgt wird. Nach der auf diese Weise genauer gestalteten Fällungsmethode von *Beyer* fanden die beiden Forscher auf Grund zahlreicher Analysen innerhalb sehr enger Fehlergrenzen genau dieselbe Menge Ammoniak wie bei der Destillation im Vakuum bei 35°. Somit fand auch durch die sehr eingehenden neuesten Untersuchungen dieser Forscher der Wert des Verfahrens zur Bestimmung des Ammoniaks im Vakuum nach *Winterstein* eine glänzende Bestätigung.

Den von *Winterstein* in Abderhaldens Handbuch (s. Abb. Bd. 2, S. 522) angegebenen Apparat zur Vakuumdestillation gestalteten wir für unsere Untersuchungen noch einfacher, insofern wir auf Druckmesser und Kühler verzichteten. Der Apparat besteht dann also lediglich aus einer mit verdünnter Schwefelsäure gefüllten Waschflasche, dem Destillationskolben und einem mit Schwefelsäure von bekanntem Gehalt beschickten Saugkolben, der an die Wasserstrahlpumpe angeschlossen ist. Wenn man bei 35° destilliert, so ist ein Kühler ganz entbehrlich, wird doch die Säure in der Absorptionsflasche kaum merklich warm. Auf einen Druckmesser kann man leicht verzichten, ebenso auf eine Vorlage zwischen Wasserstrahlpumpe und Absorptionskolben, wenn erstere gut arbeitet und der Wasserdruck gleichmäßig ist.

3 g Substanz wurden auf einem Blättchen Filtrierpapier abgewogen, ungefähr 1 g Magnesiumoxyd dazu gebracht, die Masse in das Papier gerollt und in den Kolben gebracht. Hierauf wurden 50 ccm Wasser zugegeben.

---

[1]) Zeitschr. f. phys. Chem. 47, 28, 1905.

Kolben mit Inhalt ins Wasserbad gebracht, in welchem das Thermometer hing und, nachdem die Absorptionsflasche mit Schwefelsäure beschickt war, die Verbindungen hergestellt. Durch das Filtrierpapier wurde das von *Winterstein* und *Bissegger* empfohlene Butterfett entbehrlich, denn es breitet sich alsbald nach dem Einfüllen des Wassers im Kolben aus und verhindert auf diese Weise jedes überstarke Aufschäumen während der Destillation. Außerdem bringt man durch das Einwickeln der Käsemasse in das Papier die Substanz restlos in den Kolben hinein, während sonst in dem engen Halse leicht etwas hängen bleibt. Man läßt nun zunächst Luft durch den Apparat streichen und beginnt alsdann mit dem Erhitzen des Wassers. Erst wenn nahezu die Temperatur von 35° erreicht ist, fängt man an zu evakuieren, indem man mehr und mehr die Klemmschraube zwischen Waschflasche und Lufteinsaugungsröhre schließt und dabei die Wasserstrahlpumpe ganz öffnet. Nach kurzer Zeit beginnt die Flüssigkeit im Destillationskolben zu sieden. Sobald man sich überzeugt hat, daß die Temperatur auf 35° stehenbleibt, kann man den Apparat sich selbst überlassen. Schon nach 2 Stunden ist meist alles Wasser im Kolben verdampft. Durch Öffnen der Klemmschraube läßt man nun reichlich Luft eintreten und schließt dann langsam den Wasserhahn. Die noch vorhandene Schwefelsäure wird mit Natronlauge von bekanntem Gehalt zurücktitriert.

Diese Methode der Ammoniakbestimmung ist sehr bequem und zudem außerordentlich genau. Obgleich normaler Käse nur wenig Ammoniak enthält, ergaben Parallelbestimmungen nur geringe Unterschiede. Die Bestimmung des Ammoniaks kann man auch ausführen, indem man den wässerigen Extrakt der fettfreien Käsemasse mit Phosphorwolframsäure in schwefelsaurer Lösung ausfällt und die mit 5proz. Schwefelsäure ausgewaschene Fällung mit Magnesiumoxyd unter Durchleiten von Luft im Wasserbade erhitzt.

Wurde die Vakuumdestillation in der beschriebenen Weise vorgenommen, so fanden wir im Trockenrückstand bei erneuter Destillation keine Spur von Ammoniak. Ganz anders wurde aber das Ergebnis, wenn wir nicht im Vakuum arbeiteten, sondern unter Durchleiten von Luft bei 100° destillierten. Ein derartiger Versuch liegt deshalb nahe, weil die Zusammenstellung eines dichten Vakuumapparates eine zeitraubende Arbeit ist, die sich, wenn man etwa nur *eine* Ammoniakbestimmung zu machen hat, unter Umständen nicht lohnt, falls es eine andere, vielleicht weniger genaue, aber brauchbare Methode gibt. Dies ist nun in der Tat der Fall. Bei Versuchen mit verschiedenen Käsen hat es sich herausgestellt, daß man einigermaßen brauchbare Ergebnisse für die Ammoniakbestimmung erhält, wenn man 3 g lufttrockenen, fettfreien Käsepulvers 5 Stunden lang in einem Destillationskolben erhitzt, der in kochendem Wasser steht und durch den man Luft leitet. Man kommt sogar noch etwas schneller zum Ziele, wenn man statt des siedenden Wassers einen kleinen Brenner benutzt und so aufstellt, daß durch die heiße aufströmende Luft der Kolbeninhalt auf etwa 95° gehalten wird. Ein paar Belegzahlen seien nachfolgend angeführt:

Der Ammoniakstickstoffgehalt der lufttrockenen, fettfreien Substanz von Käse 8 beträgt, nach dem Vakuumverfahren bestimmt, 0,14 Proz. Bei der Destillation unter gewöhnlichem Druck nach 5 Stunden wurden gefunden 0,15 Proz. N. Dabei war über die Hälfte der Flüssigkeit übergegangen. Nach weiteren 5 Stunden der Destillation fanden wir noch 0,04 Proz. Bei weiterem Erhitzen ging immer noch Ammoniak über, doch wurde es nicht mehr quantitativ bestimmt.

Eine andere Probe desselben Käses erhitzten wir in einem kupfernen Destillationskolben unter Zusatz von Magnesia eine halbe Stunde lang stark zum Kochen. Wir fanden trotz der kurzen Zeit schon 0,24 Proz. N, nach einer weiteren halben Stunde 0,18 Proz. Es ergaben sich also gänzlich unbrauchbare Resultate.

Um zu sehen, wie die innerhalb einer bestimmten Zeit abgespaltenen Ammoniakmengen sich zueinander verhalten, und ob schließlich die Ammoniakentwicklung einmal aufhört, wurde mit Magerkäse 7, der unnormal viel Ammoniak enthält, folgender Versuch angestellt. 10 g Käsepulver wurden in einem kupfernen Destillationskolben unter Zufügung von einem Löffelchen Magnesia mit 200 ccm Wasser zersetzt, die Mischung mit kleiner Flamme zum schwachen Sieden erhitzt und nach je einer Stunde im Destillate das Ammoniak bestimmt. Die Untersuchung nach dem Vakuumverfahren ergab für Käse 7 in einem Falle 0,48 Proz., im anderen 0,54 Proz. Ammoniakstickstoff. Beim Destillieren bei 100° unter Durchsaugen von Luft wurden nach je einer Stunde an Ammoniakstoff gefunden:

1. Stunde . . .	0,47 Proz.	2. Stunde . . .	0,06 Proz.
3. ,, . . .	0,03 ,,	4. ,, . . .	0,03 ,,
5. ,, . . .	0.03 ,,	6. ,, . . .	0,018 ,,
7. ,, . . .	0,012 ,,	8. ,, . . .	0,015 ,,
9. ,, . . .	0,021 ,,	10. ,, . . .	0,024 ,,
11. ,, . . .	0,009 ,,	12. ,, . . .	0,006 ,,
13. ,, . . .	0,006 ,,	14. ,, . . .	0,009 ,,
15. ,, . . .	0,018 ,,	16. ,, . . .	0,011 ,,
17. ,, . . .	0,005 ,,	18. ,, . . .	0,009 ,,

Der gleiche Versuch wurde noch, weniger ausgedehnt, mit Käse 5 vorgenommen, dessen Gehalt an Ammoniak 0,12 Proz. beträgt:

1. Stunde . . .	0,17 Proz.	2. Stunde	0,020 Proz.
3. ,, . . .	0,037 ,,	4. ,, ...	0,032 ,,
5. ,, . . .	0,034 ,,		

Die Hauptmenge des Ammoniaks geht also in der ersten Stunde über: sie deckt sich auch hier ungefähr mit dem durch das Vakuumverfahren ermittelten Ammoniakgehalt bzw. Ammoniakstickstoffgehalt. Es gehen immer wieder kleine Ammoniakmengen über, und ein Ende der Abspaltung läßt sich offenbar überhaupt nicht erreichen.

Zusammenfassend darf wohl folgendes über die Bestimmung des Ammoniaks im Käse als feststehend betrachtet werden:

Die seinerzeit von *Schulze* und *Winterstein* empfohlene Methode zur Ammoniakbestimmung in pflanzlichen Organen gibt, auf die Käseanalyse angewendet, sehr exakte Resultate. Der von den beiden Forschern empfohlene Apparat kann noch vereinfacht werden.

Wasserlösliche organische Substanz.

1 g Substanz wurde mit 50 ccm Wasser versetzt, durchgerührt und eine halbe Stunde stehengelassen. Man filtrierte auf ein aschenfreies Filter ab, bestimmte in dem Rückstande den Stickstoff und dampfte das Filtrat in einer Platinschale auf dem Wasserbade ein. Die Schale wurde alsdann so lange bei 50° in den Trockenschrank gebracht, bis der Unterschied zweier Wägungen nicht mehr als 1 mg betrug, was gewöhnlich nach 2 Stunden der Fall war. Nach dem Wägen wurde in der früher angegebenen Weise verascht und wieder gewogen. Die aus den Eiweißstoffen stammende Phosphorsäure und Schwefelsäure wurden als Aschenbestandteile betrachtet.

Trockenrückstand minus Asche ergab die wasserlösliche organische Substanz; Gesamtstickstoff minus dem Stickstoff der wasserlöslichen Substanz den Stickstoffgehalt der unlöslichen Substanz.

Sehr befriedigend sind die Ergebnisse mit dieser Methode nicht. Differenzen bis zu 0,5 Proz. vermochten wir nicht zu vermeiden, auch wenn wir, was natürlich Vorbedingung ist, unter stets gleichen Versuchsbedingungen arbeiteten.

Tyroalbumin.

Die Schwierigkeit bei der Bestimmung des koagulierbaren Eiweißes besteht darin, daß es zunächst nicht leicht ist, einen gut filtrierbaren Niederschlag zu erhalten. Ansäuren mit Essigsäure und Kochen führt meistens nicht zum Ziele. Auch der von *Bissegger*[1]) empfohlene Zusatz von Natriumacetat oder Kochsalz nützt bei weitem nicht immer. Nach einer Reihe von Versuchen kamen wir zu folgendem Verfahren, nach dem es immer gelingt, das Tyroalbumin restlos auszuscheiden.

1 g Substanz wird mit 50 ccm Wasser digeriert. Nach einer halben Stunde wird abfiltriert, gut ausgewaschen, Waschwasser und Filtrat mit 2 ccm einer 1 proz. Essigsäurelösung versetzt und zum Sieden erhitzt. Man gibt nun tropfenweise eine gesättigte Lösung von Kali-Alaun so lange zu, bis sich der Niederschlag zusammenballt. Dazu sind meistens nur wenige Tropfen erforderlich. Nun unterbricht man das Erhitzen. Nach wenigen Minuten hat sich der Niederschlag ganz zu Boden gesetzt, und die darüber stehende Flüssigkeit ist völlig klar. Es wird nun auf ein aschenfreies Filter abfiltriert, ausgewaschen und der Stickstoff des Niederschlages bestimmt.

Einige Doppelbestimmungen ergaben gut übereinstimmende Ergebnisse. Wir erhielten z. B. bei Magerkäse 8: 1. Bestimmung: 0,79 Proz. N; 2. Bestimmung: 0,84 Proz. N; 3. Bestimmung: 0,79 Proz. N.

Peptongemische.

Mit dem Namen Peptongemische wollen wir wasserlösliche, nicht koagulierbare, die Biuretreaktion gebende Eiweißprodukte bezeichnen, also Verbindungen von Aminosäuren. Da es uns nicht gelungen ist, wohldefinierte Polypeptide herzustellen, so haben wir obigen Namen der Bezeichnung Polypeptidgemische vorgezogen.

Da man annehmen darf, daß die Summe der Zahlen für den Stickstoffgehalt von Tyroalbumin, Peptongemischen, Basen und Aminosäuren gleich dem Stickstoffgehalte der wasserlöslichen organischen Substanz sein wird, so läßt sich der Peptonstickstoff leicht dadurch berechnen, daß man die Zahlen für den Stickstoff des Tyroalbumins und der Eiweißzersetzungsprodukte zusammenzählt und von dem Stickstoff der wasserlöslichen organischen Substanz abzieht. Für die Magerkäse 7 und 2 ergibt das folgende Zahlen, bezogen auf fettfreie Trockensubstanz:

	Magerkäse 7 Proz.		Magerkäse 2 Proz.	
N in der wasserlöslichen organischen Substanz		3,50		3,40
N im Tyroalbumin	0,70		1,62	
N in den Eiweißzersetzungsprodukten . . .	2,11	2,81	1,17	2,79
N des Peptongemisches berechnet		0,69		0,61

[1]) Zeitschr. f. phys. Chem. 47, 28, 1905.

Gehen bei der Gesamteiweißstickstoffbestimmung die Peptone nahezu quantitativ in den Kupferhydroxyd- bzw. in den Bleiessigniederschlag ein, so müssen sie sich auch quantitativ in der Weise bestimmen lassen, daß man in dem wässerigen Auszug des Käsepulvers zunächst das Albumin ausfällt und im Filtrat die Peptongemische mit einem der genannten Fällungsmittel bestimmt. Man hat dabei noch den Vorteil, daß man in dem Filtrat der Peptone die Eiweißzersetzungsprodukte vorfindet, deren Stickstoff sich nun leicht nach *Kjeldahl* bestimmen läßt. Diese Zahl muß dann annähernd übereinstimmen mit der Summe der Zahlen für den Stickstoff der Basen und Aminosäuren. Wir erhielten für Magerkäse 7 folgende Werte: Tyroalbumin 0,75 bzw. 0,72 Proz. N; Peptongemische 0,50 Proz. N mit Bleiessig und 0,53 Proz. N mit Kupferhydroxyd. In den Filtraten dieser beiden Niederschläge als N der Eiweißzersetzungsprodukte jedesmal 2,11 Proz. Für Magerkäse 2 lauten die entsprechenden Zahlen: Tyroalbumin 1,60 und 1,63 Proz. N; Peptongemische 0,87 und 0,96 Proz.; Eiweißzersetzungsprodukte 1,20 und 1,14 Proz. N. Diese auffallend übereinstimmenden Zahlen sprechen für den Wert beider Methoden. Vergleicht man indessen die analytisch gefundenen Zahlen für den Peptonstickstoff mit den berechneten obiger Tabelle, so sind die Ergebnisse wenig befriedigend, ist doch die Differenz in einem Falle 0,2, im anderen sogar 0,3 Proz.

Vergleicht man die Mittelzahlen für den Stickstoff der Eiweißzersetzungsprodukte, wie man sie nach dem soeben beschriebenen Verfahren erhielt, mit den früher für N der Eiweißzersetzungsprodukte ermittelten Zahlen (vgl. Tabelle I), so herrscht verhältnismäßig gute Übereinstimmung. Für Magerkäse 7: Im Filtrat des Peptonniederschlages 2,11 Proz. N, nach Tabelle I: 2,21 Proz. N. Für Magerkäse 2 sind die Zahlen: 1,17 und 1,33.

Caseoglutin.

Zur Bestimmung dieser eigenartigen Eiweißsubstanz wurde eine Reihe von Vorversuchen angestellt. Behandelt man das lufttrockne Käsepulver mit Alkohol von verschiedener Konzentration, so wird stets Caseoglutin in Lösung gehen. Dabei scheint 80proz. Alkohol die größte Lösungsfähigkeit zu haben. Aber auch absoluter Alkohol löst noch beträchtliche Mengen von Caseoglutin. Im Cheddarkäse z. B. fanden wir bei zweimaliger Behandlung von 1 g mit je 25 ccm absoluten Alkohols je 5 Minuten lang 0,09 Proz. Caseoglutinstickstoff. Mit 80proz. Alkohol unter den gleichen Bedingungen 0,74 Proz. N.

Wir ließen dann auf Cheddarkäse erst 95proz., dann 80proz. und zuletzt 60proz. Alkohol in der angegebenen Weise einwirken und fanden an Caseoglutinstickstoff: 0,05, 0,14 und 0,18 Proz. Demnach scheint es, daß absoluter Alkohol eine Umwandlung der mit Caseoglutin bezeichneten Eiweißstoffe vornimmt, so daß diese dann nicht mehr mit 80proz. Alkohol in der gleichen Menge extrahiert werden können wie vorher.

Da der mit 80proz. Alkohol zweimal extrahierte Rückstand immer noch weitere, nicht unbeträchtliche Mengen von Caseoglutin enthielt und die einzelnen Bestimmungen schlecht übereinstimmende Ergebnisse aufwiesen, so wurde nunmehr 1 g Substanz mit 25 ccm 80proz. Alkohol unter Benutzung des Rückflußkühlers eine halbe Stunde gekocht. Der Alkohol wurde bis auf einen kleinen Rest abgedampft, dieser in Wasser gegossen, das Caseoglutin abfiltriert und der Stickstoff bestimmt. Wir fanden 1,08 Proz. N (immer auf die lufttrockne Käsemasse bezogen). Der Rückstand, in der

gleichen Weise behandelt, ergab aber immer noch 0,21 Proz. Caseoglutinstickstoff. Nach der dritten halben Stunde der Extraktion und Eingießen in Wasser fand keine Abscheidung von Caseoglutin mehr statt. Auf Grund dieser Vorversuche verfuhren wir folgendermaßen:

1 g des lufttrocknen Käsepulvers wird mit 25 ccm 80proz. Alkohol 1 Stunde lang am Rückflußkühler gekocht. Der Alkohol wird bis auf einen kleinen Rest verdampft, der Rückstand in viel Wasser gegossen, vom ausgeschiedenen Caseoglutin abfiltriert, mit Wasser ausgewaschen und der Stickstoff nach *Kjeldahl* bestimmt. Der auf diese Weise festgestellte Caseoglutinstickstoffgehalt für Cheddarkäse betrug 2,08 und 2,13 Proz.

Harnstoff.

Wie in der Einleitung erwähnt wurde, hat *E. Winterstein*[1]) im Magerkäse Harnstoff nach der Methode von *R. Fossé* mit Xanthydrol nachgewiesen. Er verwendete etwa 5 kg Käse, aus dem in einem längeren Prozesse das Harnstoffdixanthyl dargestellt wurde. Es fragt sich nun, ob sich der Harnstoff im Käse quantitativ mit Xanthydrol unter Benutzung einer kleineren Menge Ausgangsmaterial nach einer verhältnismäßig einfachen Methode bestimmen läßt.

Wir kochten 30 g Käsepulver dreimal mit 96proz. Alkohol, dampften die vereinigten Extrakte bis auf 2 bis 3 ccm ein und setzten 25 ccm Wasser hinzu. Vom Caseoglutin wurde abfiltriert, das Filtrat auf 5 ccm eingedampft, 15 ccm Eisessig und 2 ccm einer konzentrierten Lösung von Xanthydrol in absolutem Alkohol zugegeben. Wir bekamen auf diese Weise anfangs regelmäßig Niederschläge, die sich aber dann als nicht aus Harnstoffdixanthyl bestehend erwiesen. Da uns das Xanthydrol als angeblich reines Reagens übergeben worden war, so kosteten uns die ersten Versuche sehr viel Zeit und Mühe. Wir fanden regelmäßig sowohl in den künstlich hergestellten Harnstofflösungen als auch in den auf die soeben beschriebene Weise erhaltenen Käseextrakten eine Art von Kristallen, die unter dem Mikroskop eine charakteristische wetzsteinartige Form zeigten und sich von den viel kleinen, feinen Nadeln des Xanthons deutlich unterschieden; wir hielten sie für Harnstoffdixanthylkristalle. Erst die Ermittlung des Schmelzpunktes, der bei 140° lag, während sich Harnstoffdixanthyl bei etwa 260° zersetzt, brachte uns auf den Irrtum. Nach Beschaffung eines guten Xanthydrolpräparates, das sich von dem zuerst verwendeten schon durch sein gänzlich anderes Lösungsverhältnis zu Alkohol unterschied, fanden wir jene wetzsteinartige Kristallform nicht mehr, sondern feine Nadeln, die sich bei etwa 100facher Vergrößerung kaum von den Kristallen unterschieden, die man erhält, wenn man in säurefreies oder nicht genügend angesäuertes Wasser eine Lösung von Xanthydrol tropft, und die aus Xanthon bestehen dürften, da sich Xanthydrol offenbar sehr leicht oxydiert. Verfuhren wir nach der Angabe von *R. Fosse* (Ann. de l'inst. Pasteur. **30**, 525, 1916), bzw. nach *O. Winterstein*[2]), der das *Fosse*sche Verfahren nachgeprüft hat, so erhielten wir in künstlich hergestellten Harnstofflösungen in kurzer Zeit die Harnstoffdixanthylkristalle mit dem von *Fosse* angegebenen Schmelzpunkt. Dagegen bekamen wir in den Käseextrakten keine Fällung.

Wir vermischten 10 g Käsepulver mit 2 mg Harnstoff, behandelten das Gemisch wie oben angegeben, ohne einen Niederschlag zu erhalten,

---

[1]) Zeitschr. f. phys. Chem. **105**, 25, 1919.

[2]) Diss. Zürich 1918.

während 2 mg Harnstoff in Wasser gelöst einen voluminösen Niederschlag von Dixanthylharnstoff ergaben. Die im Käse vorhandenen Spuren von Harnstoff lassen sich somit augenscheinlich, wenn man nicht von größeren Mengen Käse ausgeht, nach der *Fosse*schen Methode nicht nachweisen. Immerhin wäre es von Interesse, weitere Versuche anzustellen, etwa im Anschluß an die oben erwähnte, interessante Arbeit von *O. Winterstein*, der mit Xanthydrol den Harnstoff im Blute und im Harn bestimmte.

Auch in der Milch, ausgehend von 100 ccm, gelang es uns nicht, mit Xanthydrol Harnstoff nachzuweisen.

B. Das Ergebnis der Untersuchung der einzelnen Käse.

Da sich vorliegende Untersuchung nur auf Magerkäse erstrecken soll, so zogen wir andere Käsearten nur zum Vergleiche heran. Die Zahlen des mit *Bissegger* bezeichneten Fettkäses entnahmen wir der Dissertation *Walter Bisseggers* (Zürich 1907) in die Tabellen II und III auf.

In den Tabellen I bis III sind, wie ersichtlich, die Fettkäse von den Magerkäsen und diese wieder von dem untersuchten mageren Weichkäse, dem Tilsiter, getrennt. Bei der Betrachtung der Zusammensetzung der frischen Käse in Tabelle II fällt sofort der Unterschied im Wassergehalte der drei Guppen auf. Die Magerkäse enthalten etwa 16 Proz. mehr Wasser als die fetten Hartkäse. Der Cheddarkäse als fetter Weichkäse ist wesentlich wasserreicher als die fetten Hartkäse; der magere Weichkäse, der Tilsiter, enthält dagegen noch etwa 10 Proz. mehr Wasser als die mageren Hartkäse. So ist von vornherein, vom Fettgehalt ganz abgesehen, die mindere Qualität der Magerkäse dem Emmentaler Fettkäse gegenüber bedingt.

Der Aschengehalt der frischen Hartmagerkäse ist um etwa 2 bis 3 Proz. höher als derjenige der Fettkäse.

Daß der Gesamtstickstoffgehalt der frischen Magerkäse um etwa 1 Proz. höher ist als derjenige der frischen Fettkäse, hat seine rein äußere Ursache in dem geringeren Fettgehalte der ersteren, denn ein Blick auf Tabelle III zeigt sofort, daß der Gesamtstickstoff von Fett- und Magerkäsen in den wasser-, fett- und aschenfreien Produkten durchschnittlich der gleiche ist. Ganz anders verhält es sich indessen mit dem Gesamteiweißstickstoff. Er ist (vgl. Tabelle III) bei den Magerkäsen höher als bei den Fettkäsen, und erstere enthalten daher mehr Eiweiß als letztere. Damit hängt zusammen, daß die Mengen der Eiweißzersetzungsprodukte der Fettkäse im Durchschnitt erheblich größer sind als die der Hartmagerkäse. Für den Tilsiter trifft dies, trotz seines geringen Fettgehalts und seines geringen Alters, nicht zu. Die Reifung der mageren Weichkäse verläuft augenscheinlich ganz anders als die der Hartmagerkäse.

Betrachten wir die Zahlen für den Stickstoff der organischen Basen und der Aminosäuren in Tabelle III, so ergibt sich, daß die Magerkäse weniger Aminosäuren enthalten als die Fettkäse, die ja auch gerade durch die Aminosäuren ihren charakteristischen Geschmack erhalten sollen. Der Gehalt der einzelnen Käse an organischen Basen ist sowohl bei Fett- als auch bei Magerkäsen sehr verschieden, und es läßt sich zunächst kein Bild über Art und Ursache der Bildung dieser primären Eiweißspaltungsprodukte gewinnen. Auffallend ist es allerdings, daß der nur 2 Monate alte Tilsiter den höchsten Gehalt an durch Phosphorwolframsäure fällbaren Stickstoffverbindungen aufweist, ein Umstand, der auch in dem hohen Stickstoffgehalt

Tabelle I.

Zusammensetzung der lufttrockenen, fettfreien Käse (nach abnehmendem Fettgehalt geordnet).

Name	Alter in Monaten	Wasser im frischen Käse	Wasser im lufttrockenen, fettfreien Käse	Ätherextrakt im lufttrockenen Käse	Gesamt-N	Gesamt-Eiweiß-N	N der Eiweißabbauprodukte	N der Basen[1])	N des Ammoniaks	N der Aminosäure	Asche	Wasserlösliche Substanz	Asche darin	Wasserlösliche organische Substanz	N darin
		Proz.	Proz.	Proz.	Proz.	Proz.	Proz.	Proz.	Proz.	Proz.	Proz.	Proz.	Proz.	Proz.	Proz.
Emmentaler Fettkäse	10	31,6	10,2	47,18	10,98	9,28	1,70	0,05	0,17	1,56	9,15	28,3	5,5	22,7	2,5
Cheddarkäse	16	42,5	8,4	45,13	10,57	8,13	2,44	0,70	0,04	1,75	9,32	28,7	6,5	22,2	2,9
Magerkäse 1	—	46,7	4,9	17,34	10,77	9,52	1,25	0,87	0,21	0,08	14,75	31,3	7,8	23,5	2,9
„ 2	8	43,5	6,8	17,18	10,78	9,45	1,33	0,30	0,19	0,84	15,45	34,4	11,4	23,0	3,4
„ 3	—	52,1	12,0	14,25	9,67	8,21	1,46	0,82	0,19	0,59	15,90	—	—	—	—
„ 4	—	47,0	9,0	11,16	10,43	9,33	1,10	0,46	0,28	0,66	14,44	35,6	12,7	22,9	2,9
„ 5	7	48,1	13,1	9,03	10,31	9,22	1,09	0,48	0,12	0,49	13,14	31,4	9,1	22,3	3,5
„ 6	7	47,6	8,4	8,30	10,87	9,88	0,99	0,26	0,16	0,57	12,95	31,7	7,9	23,8	3,2
„ 7	15	44,9	5,9	7,80	10,73	8,52	2,21	0,13	0,51	1,40	14,75	37,0	11,5	25,5	3,5
„ 8	4	47,9	8,8	4,10	10,32	9,34	0,98	0,42	0,14	0,53	14,92	29,4	7,9	21,4	2,9
„ 9	7	45,1	5,9	0,88	10,82	9,73	1,09	0,36	0,13	0,58	15,46	32,6	8,2	24,2	3,2
Tilsiter Käse	2	57,5	12,9	5,66	10,42	8,70	1,72	0,87	0,22	0,63	10,83	29,4	6,0	23,4	4,2

[1]) bzw. der durch Phosphorwolframsäure fällbaren Verbindungen.

Tabelle II.

Zusammensetzung der frischen Käse, nach abnehmendem Fettgehalt geordnet (aus Tab. I berechnet).

Name	Alter in Monaten	Wasser	Ätherextrakt	Asche	Gesamt-N	Gesamt-Eiweiß-N	N der Eiweißzersetzungsprodukte	N der organischen Basen	N des Ammoniaks	N der Aminosäure	Wasserlösliche organische Substanzen	N darin
		Proz.	Proz	Proz.	Proz.	Proz.	Proz.	Proz.	Proz.	Proz.	Proz.	Proz.
Fettkäse, *Bissegger* .	8	31,1	32,70	4,53	4,59	3,67	0,92	0,35	0,02	0,47	—	—
Emmentaler Fettkäse . .	10	31,3	36,10	3,31	3,98	3,37	0,61	0,02	0,06	0,56	8,9	0,9
Cheddarkäse	16	42,5	28,38	2,96	3,36	2,58	0,78	0,22	0,01	0,55	6,7	0,9
Magerkäse 2	8	43,5	10,44	7,64	5,33	4,67	0,66	0,15	0,09	0,41	11,3	1,7
„ 1	—	46,7	9,71	6,76	4,93	4,36	0,57	0,39	0,10	0,03	10,7	1,3
„ 3	—	52,1	7,75	7,25	4,41	3,75	0,66	0,37	0,08	0,27	—	—
„ 4	—	47,0	6,42	7,39	5,34	4,78	0,56	0,08	0,14	0,33	12,9	1,6
„ 5	7	48,1	5,23	7,06	5,54	4,95	0,59	0,26	0,06	0,26	11,9	1,8
„ 6	7	47,6	4,75	6,73	5,65	5,13	0,51	0,13	0,08	0,29	12,4	1,7
„ 7	15	44,9	4,56	7,92	5,76	4,57	1,19	0,07	0,27	0,75	13,4	1,8
„ 8	4	47,9	2,34	8,14	5,63	5,09	0,54	0,23	0,07	0,29	11,6	1,6
„ 9	7	45,1	0,51	8,93	6,25	5,62	0,63	0,21	0,07	0,33	14,0	1,8
Tilsiter Käse	2	57,5	2,76	4,94	4,75	3,97	0,78	0,41	0,11	0,29	10,7	1,9

Tabelle III.

Zusammensetzung der fett-, wasser- und aschefreien Käsemasse nach fallendem Fettgehalt geordnet.

Name	Alter in Monaten	Ätherextrakt im frischen Käse	Gesamt-N	Gesamt-Eiweiß-N	N der Eiweißzersetzungsprodukte	N der organischen Basen	N des Ammoniaks	N der Monoaminosäure	Wasserlösliche organische Substanzen	N darin
		Proz.	Proz.	Proz.	Proz.	Proz.	Proz.	Proz.	Proz.	Proz.
Fettkäse, *Bissegger* .	8	32,70	14,48	11,57	2,91	1,13	0,06	1,50	—	—
Emmentaler Fettkäse	10	36,10	13,61	11,50	2,11	0,06	0,19	1,91	28,1	3,1
Cheddarkäse	16	28,38	12,84	9,87	2,97	0,85	0,05	2,12	26,0	3,0
Magerkäse 2	8	10,44	13,87	12,15	1,72	0,40	0,24	1,08	29,5	4,4
„ 1	—	9,71	13,41	11,84	1,57	1,09	0,27	0,11	29,2	3,6
„ 3	—	7,75	13,40	11,41	1,99	1,13	0,26	0,82	—	—
„ 4	—	6,42	13,62	12,18	1,44	0,21	0,36	0,86	32,9	4,1
„ 5	7	5,23	13,98	12,50	1,48	0,65	0,17	0,66	29,7	4,5
„ 6	7	4,75	13,82	12,56	1,26	0,33	0,20	0,72	30,2	4,1
„ 7	15	4,56	13,52	10,73	2,79	0,17	0,65	1,76	31,5	4,2
„ 8	4	2,34	13,52	12,24	1,28	0,53	0,14	0,68	28,0	3,8
„ 9	7	0,51	13,75	12,37	1,38	0,45	0,16	0,73	30,5	4,0
Tilsiter Käse	2	2,76	13,64	11,40	2,24	1,14	0,28	0,82	30,6	5,4

Tabelle IV.

	Gehalt der wasser-, fett- und aschefreien Käse an		
	Tyroalbumin-stickstoff Proz.	Caseoglutin-stickstoff Proz.	Peptonstickstoff Proz.
Emmentaler Fettkäse . .	0,94	2,22	—
Cheddarkäse	0,76	2,49	—
Magerkäse 2	2,07	2,90	1,17
„ 7	0,84	3,51	0,63
„ 8	1,07	3,52	—

der wasserlöslichen organischen Substanz dieses Käses seine Bestätigung findet.

Ferner ist es eigentümlich, daß der eine Emmentaler Fettkäse nur eine geringe Menge von Basen enthält, dafür aber sehr viel Aminosäuren, während bei einem Magerkäse (Nr. 1) das Verhältnis gerade umgekehrt ist.

Alle bis jetzt gepflogenen Betrachtungen gelten für *einen* Magerkäse nicht, nämlich für Käse 7. Er wurde zufällig zuletzt untersucht und warf dann die Allgemeingültigkeit aller soeben vorgebrachten Überlegungen einfach um. Wegen der ganz ungewöhnlichen Zahlen wurde der Käse wiederholt untersucht und immer mit genau dem gleichen Ergebnis. Rein äußerlich unterschied er sich in frischem Zustande nicht sehr von den anderen; er war nur etwas bräunlicher und ein wenig zäher, doch von gutem Geschmack. Auf eine Anfrage hin erhielten wir von der Schweiz. Exportgesellschaft f. Emmentaler Käse die Mitteilung, daß der Magerkäse bei der Herstellung nicht anders behandelt worden wäre als die anderen uns zur Untersuchung übergebenen Arten, daß man aber mit Absicht auch gerade diesen Käse wegen seines für einen Magerkäse ungewöhnlich hohen Alters mit ausgewählt hätte. Leider gelang es uns nicht, noch eine Probe eines so alten Magerkäses zu erhalten.

Was beim Magerkäse 7 besonders auffällt, ist die weitgehende Eiweißzersetzung: sie ist ebenso groß wie bei den Fettkäsen. Organische Basen sind nur in geringer Menge vorhanden; dagegen ist die Menge der Monoaminosäuren so groß, daß sie das Doppelte des bei den Magerkäsen vorkommenden Höchstgehalts noch übersteigt. Es fragt sich, ob die Ursache nur dem hohen Alter des Käses zuzuschreiben ist, wird doch die Käsereifung noch durch mancherlei andere Umstände, wie z. B. Milchbeschaffenheit, Bakterienflora, Temperatur bei der Herstellung und der Reifung beeinflußt.

Sehr auffallend ist die große Menge von Ammoniak in Käse 7. Auch sie ist mehr als doppelt so groß bei dem Magerkäse, der nach ihm am meisten Ammoniak enthält. Während Käse 7 in bezug auf die Stickstoffverbindungen den Fettkäsen gleicht, unterscheidet er sich im NH_3-Gehalt von ihnen. Gegen einen Fäulnisvorgang spricht der gute Geschmack. Auf alle Fälle zeigt aber der hohe Ammoniakgehalt, daß die Art und Weise der Reifung anders verlaufen sein mußte als bei den Fettkäsen. Es wäre ja auch möglich, daß ein bestimmter Mikroorganismus diese besondere Art der Reifung bewirkt hat, so daß das Alter des Käses überhaupt keinen Einfluß hätte. Sollte dies aber nicht der Fall sein und vielmehr ganz allgemein alte Magerkäse eine den Fettkäsen ähnliche Zusammensetzung aufweisen, soweit es sich um die Eiweißzersetzungsprodukte handelt,

so läge vielleicht für die praktische Käsereitechnik die Frage nahe, ob nicht die Magerkäse erst in einem älteren Stadium zum Verkaufe kommen sollten. Wenn auch der Fett- und Wassergehalt immer von entscheidender Bedeutung für den Wert eines Käses sein werden, so wäre es doch immerhin möglich, daß Geschmack und Nährwert eines weiter gereiften Magerkäses ganz anders sind als in einem verhältnismäßig jungen Käse.

Um wie vieles haltbarer Fettkäse als Magerkäse sind, zeigt folgender Versuch: Von einigen der untersuchten Käse wurde je ein kleines Stück im ursprünglichen feuchten Zustande in Gläsern aufbewahrt. Während der Emmentaler Fettkäse selbst nach einem Monat keinerlei äußere Veränderung zeigte, bildeten sich auf den Oberflächen des so aufbewahrten Magerkäses Nr. 9 und des Tilsiter Käses bald Schimmelpilze. Letzterer war nach 14 Tagen übelriechend und ganz ungenießbar geworden. Von jeder der drei Proben hatten wir sofort bei Beginn der Untersuchungen Ammoniakbestimmungen in frischem Zustande gemacht, und dies dann in gewissen Zwischenpausen wiederholt. Folgendes sind die Ergebnisse:

Datum		Tilsiter Käse Proz.
13. VI.	Ammoniakstickstoff .	0,14
16. VI.	" .	0,20
20. VI.	" .	0,37
25. VI.	" .	0,55

Die erste Bestimmung geschah unmittelbar nach der Entnahme der Probe von dem großen Stück im Käsekeller. 12 Tage später war also der Ammoniakgehalt schon um das Vierfache gestiegen.

Datum		Magerkäse Nr. 9 Proz.
26. V.	Ammoniakstickstoff .	0,08
2. VI.	" .	0,09
28. VI.	" .	0,41

Die Ammoniakbildung verlief hier erheblich langsamer. Während der Ammoniakgehalt beim Tilsiter nach 8 Tagen schon um fast das Dreifache gestiegen war, nahm er bei dem Magerkäse in der ersten Woche nur wenig zu, stieg allerdings dann nach 33 Tagen um das Fünffache.

Datum		Emmentaler Fettkäse Proz.
22. VI.	Ammoniakstickstoff .	0,11
24. VI.	" .	0,10
28. VI.	" .	0,10
18. VII.	" .	0,11

Da die Untersuchungen des Tilsiter und des Magerkäses in eine sehr heiße Zeit fielen, während der Fettkäse später untersucht wurde, so war es nicht ausgeschlossen, daß dadurch das Ergebnis beeinflußt sein konnte. Von den zu untersuchenden Käsen hatten wir frisches Material nicht mehr zur Verfügung, und wir kauften uns daher in einer Handlung je ein Stück Magerkäse und Fettkäse lediglich zur Nachprüfung der obigen Untersuchung.

Datum		Magerkäse Proz.	Fettkäse Proz.
1. VII.	Ammoniakstickstoff .	0,06	0,18
7. VII.	" .	0,10	0,15
15. VII.	" .	0,13	0,15
30. VII.	" .	0,19	—

Die Fettkäseprobe verdarb uns leider durch ein Mißgeschick. Immerhin bestätigen auch diese beiden Untersuchungsreihen das Ergebnis von vorhin. Hier zeigte allerdings auch der Fettkäse schon nach 8 Tagen geringe Schimmelbildung, wohingegen der Magerkäse immer dunkler und zuletzt schwarz gefärbt war.

Die Versuche zeigen auch in bezug auf ihre Haltbarkeit die gänzlich andere Art von Emmentaler Fettkäse gegenüber Magerkäse und magerem Weichkäse. Während diese alsbald nach der Entnahme aus dem Käsekeller und dem Anschneiden eine Ammoniakzunahme zeigen, ändert sich die Ammoniakmenge der Emmentaler Fettkäse längere Zeit offenbar gar nicht.

Was die in der Einleitung aufgeworfene Frage anbelangt, ob etwa, da Fettkäse mehr Eiweißzersetzungsprodukte aufweisen als Magerkäse, auch fettere Magerkäse davon mehr besitzen als fettarme, so scheint es allerdings, wenn man von Nr. 7 absieht, daß die Frage bejaht werden darf; doch müßte noch eine erheblich größere Anzahl von Magerkäsen untersucht werden, um über diese Frage Klarheit zu erhalten. Bei einer derartigen Massenuntersuchung müßte aber auch das Alter der Käse angegeben werden, das wahrscheinlich eine größere Rolle in der Zusammensetzung spielt, als man bisher annahm.

In der Einleitung wurde erwähnt, daß *Bondzynski* zwischen Umfang und Tiefe der Käsereifung unterscheidet, wobei er unter Umfang die Menge der wasserlöslichen organischen Substanz, unter Tiefe die der Eiweißzersetzungsprodukte versteht. Zur Beurteilung dieser Frage kommt in unserem Falle natürlich nur Tabelle III in Betracht, denn wenn in den frischen Käsen die Zahlen für die wasserlösliche organische Substanz der Fettkäse so wesentlich geringer sind als die der Magerkäse, so kommt das auch wieder von den größeren Zahlen für Fett plus Wasser in den Fettkäsen. Doch auch der Vergleich der fett-, wasser- und aschenfreien Käsemasse miteinander scheint zu zeigen, daß die Menge der wasserlöslichen organischen Substanz in den Fettkäsen etwas geringer ist, sofern die verhältnismäßig geringere Zahl der untersuchten Käse überhaupt einen Schluß erlaubt. Sehr auffallend ist der Unterschied im Stickstoffgehalt der organischen H_2O löslichen Substanz zwischen Fett- und Magerkäsen. Erstere enthalten davon etwa 25 Proz. weniger als die Magerkäse. Ganz besonders hoch ist der Stickstoffgehalt der wasserlöslichen organischen Substanz im Tilsiter Käse, der überhaupt eine von den trocknen Magerkäsen ganz verschiedene Zusammensetzung hat.

Die Untersuchung auf Tyroalbumin-, Caseoglutin- und Peptonstickstoff wurde nur auf wenige Käse ausgedehnt, da es uns einstweilen nur darauf ankam, die geeigneten Methoden zu ihrer Bestimmung herauszufinden. Massenuntersuchungen dürften auch hier Ergebnisse von Interesse zeitigen. Die Menge des Caseoglutins ist in den Fettkäsen offenbar erheblich geringer als in den Magerkäsen (vgl. Tabelle IV). Diese Erscheinung ist von praktischer Bedeutung, denn das Caseoglutin gibt den Käsen Geschmeidigkeit

und Weichheit; da aber Fett ähnlich wirkt, so brauchen auch die Magerkäse, um genießbar zu sein, erheblich mehr von diesem Eiweißstoff.

Auch in bezug auf seinen Tyroalbumin- und Peptongehalt weicht Magerkäse 7 augenscheinlich wieder wesentlich von den anderen Magerkäsen ab.

In der Einleitung wurden die Beobachtungen von *Slyke* und *Hart* über die verschiedenartige Löslichkeit von Stickstoffverbindungen in reinem Wasser und Salzwasser bei zunehmender Käsereifung erwähnt. Wir vermochten im Rahmen dieser Arbeit nicht näher auf die Versuche der beiden Forscher einzugehen. Wir begnügten uns damit, in zwei Käsen die Löslichkeit stickstoffhaltiger organischer Substanz in 5proz. Salzwasser festzustellen und sie mit der früher festgestellten Löslichkeit in reinem Wasser zu vergleichen. Der Stickstoffgehalt der in reinem Wasser löslichen organischen Substanz von Magerkäse 2 betrug 3,4 Proz. des lufttrocknen, fettfreien Käsepulvers. Bei der Extraktion mit Salzwasser fanden wir dagegen 2,5 Proz. Beim Cheddarkäse sind die beiden Zahlen 2,9 und 2,8, somit ist unter Berücksichtigung der Fehlergrenzen beim Cheddarkäse kein Unterschied vorhanden.

II. Qualitative Untersuchungen.

Da die quantitative Untersuchung von Magerkäsen wesentliche Unterschiede zwischen ihrer Zusammensetzung und derjenigen von Fettkäsen ergab, so wurde nunmehr die Frage geprüft, ob etwa die von *E. Winterstein* und seinen Mitarbeitern ausgearbeiteten qualitativen Untersuchungsmethoden von Emmentaler Käse abweichende Ergebnisse zwischen Fett- und Magerkäse zeitigen würden.

2,7 kg des getrockneten Magerkäsepulvers wurden mit der vierfachen Menge 80proz. Alkohols 5 Stunden lang unter Benutzung eines Rückflußkühlers gekocht. Der Alkohol wurde heiß durch ein Tuch vom Rückstande abfiltriert, dieser abgepreßt, zerkleinert, mit 3 Litern Alkohol 12 Stunden lang stehengelassen, abermals abfiltriert und abgepreßt. Der Alkohol der vereinigten Filtrate wurde bis auf ein Volumen von etwa einem Liter abdestilliert und der Rest in etwa 8 Liter Wasser gegossen. Nachdem sich das ausgeschiedene Caseoglutin abgesetzt hatte, wurde die darüber stehende Flüssigkeit abgehebert, der Rest abgenutscht, das Caseoglutin wiederholt mit Wasser ausgewaschen und mit absolutem Alkohol getrocknet.

Caseoglutin.

Man kann zur Darstellung des Caseoglutins auch so verfahren, daß man Magerkäse mit der fünf- bis zehnfachen Menge 80proz. Alkohols einigemal auskocht, die vereinigten Filtrate durch Destillation von Alkohol befreit und die verbleibende gelbe Lösung in viel Wasser gießt, wobei sich in den meisten Fällen das Caseoglutin flockig ausscheidet. Ist dies nicht der Fall, so fügt man zu der milchigen Flüssigkeit so lange verdünnte Natronlauge, bis eben Lösung erfolgt ist, gibt vorsichtig verdünnte Essigsäure hinzu, bis die Ausflockung beginnt, sammelt den Niederschlag auf einem Filter und trocknet ihn mit Alkohol und Äther.

Wie aus dem analytischen Teile dieser Arbeit hervorgeht, löst sich das Caseoglutin beim Extrahieren von Magerkäse in Alkohol von verschiedener Konzentration. Das von uns untersuchte Caseoglutin enthielt 12,5 Proz.

Stickstoff. Es gab mit Glyoxylsäure und Schwefelsäure die Tryptophanreaktion. Die *Millon*sche Reaktion fiel positiv aus. Nachfolgend führen wir im Zusammenhang mit unseren eigenen Untersuchungen die Ergebnisse einer Arbeit über Caseoglutin an, die vor Jahren *Winterstein* und *Suszuki* im agrikulturchemischen Laboratorium der Eidgenössischen Technischen Hochschule ausführten. Aus diesen Untersuchungen geht hervor, daß Caseoglutin bei der Spaltung mit Säuren die Basen Histidin, Arginin und Lysin liefert.

10 g Caseoglutin = 9,39 g Trockensubstanz wurden mit 100 ccm reiner konzentrierter Salzsäure am Rückflußkühler 10 Stunden lang gekocht, abgekühlt, mit Wasser verdünnt, filtriert und das Filtrat auf 500 ccm aufgefüllt. Aliquote Teile dienten zur Bestimmung von Gesamtstickstoff, Basenstickstoff und Ammoniakstickstoff. Es wurde gefunden:

	Trockensubstanz Proz.	Gesamt-N Proz.
Gesamtstickstoff	15,22	100,0
N im P. W. Säureniederschlag	4,92	32,5
Ammoniakstickstoff	1,82	11,9
N in den organischen Basen .	3,10	20,4

Untersuchung auf einzelne Basen.

69,1 g getrocknetes Caseoglutin wurden in einem größeren Kolben mit einem Liter konzentrierter Salzsäure auf dem Wasserbade sehr langsam erwärmt, dann allmählich auf freier Flamme 2 Stunden lang stark gekocht und das Kochen schließlich unter Benutzung eines Rückflußkühlers noch 10 Stunden fortgesetzt. Nach dem Erkalten wurde mit einem Liter Wasser verdünnt und abfiltriert. Es blieb nur eine sehr kleine Menge schwarzer, huminähnlicher Substanz auf dem Filter zurück. Die dunkel gefärbte Lösung wurde mit Phosphorwolframsäure versetzt, bis ein geringer Überschuß vorhanden war, der Niederschlag nach 24 Stunden auf die Nutsche gebracht und so lange mit 5proz. Schwefelsäure ausgewaschen, bis im Filtrat keine Salzsäure mehr vorhanden war. Da aber dann der Niederschlag immer noch freie Salzsäure enthält, so wurde er in einer Reibschale gut verrieben, wieder abgenutscht und die Operation noch zweimal wiederholt. Die Basen wurden mittels Baryts freigemacht, Ammoniak durch Luft und überschüssiges Barium mit Kohlensäure beseitigt und durch das schließlich erhaltene, klare Filtrat so lange Kohlensäure eingeleitet, bis die Flüssigkeit neutral oder schwach sauer war. Die Isolierung der Basen geschah nach dem Verfahren, wie es *E. Winterstein* in seinen Arbeiten über Käse beschrieben hat.

Wir fanden in 69,1 g Caseoglutin:

2,12 g	Histidinchlorid, entsprechend	1,852 g	oder	2,3	Proz.	Histidin,
1,47 g	Argininkupfernitrat, ,,	0,871 g	,,	1,26	,,	Arginin,
3,00 g	Lysinchlorid ,,	2,001 g	,,	2,90	,,	Lysin.

Der nach der Extraktion mit Alkohol verbliebene ausgepreßte Kuchen wurde mit der Hand gut zerkleinert, mit etwa 6 Litern heißen Wassers versetzt, die Flüssigkeit nach längerem Stehen durch ein Tuch filtriert, nochmals mit 3 Litern Wasser aufgeschwemmt, wieder filtriert und abgepreßt. Das so zurückgebliebene Tyrocasein wurde nicht weiter untersucht.

Untersuchung auf Polypeptide bzw. Peptone und organische Säuren.

Aus den früher mitgeteilten analytischen Daten ist ersichtlich, daß Magerkäse wasserlösliche, durch Schwermetalle nicht fällbare Eiweißspaltungsprodukte enthält. Fällt man den wässerigen Extrakt eines Magerkäses mit Bleiessig oder Kupferhydroxyd und zerlegt den Niederschlag, so findet man zwar keine kristallinischen Eiweißspaltungsprodukte, wohl aber nicht unbeträchtliche Mengen von Peptonen bzw. Polypeptiden.

Das Filtrat vom Caseoglutinniederschlag und die Wasserextrakte wurden vereinigt und so lange mit Bleiessig versetzt, bis keine Fällung mehr auftrat. Nach etwa 12 Stunden hatte sich der voluminöse Niederschlag so weit abgesetzt, daß die darüberstehende klare Flüssigkeit abgehebert werden konnte. Der Rückstand wurde mit 2 Litern Wasser versetzt, umgerührt, 1 bis 2 Stunden stehengelassen, die klare Flüssigkeit ebenfalls abgehebert und diese Art des Auswaschens noch dreimal wiederholt. Die zurückgebliebene wässerige Suspension wurde mit Schwefelwasserstoff zersetzt, die bleifreie Lösung auf dem Wasserbade bis zur Sirupdicke eingedampft und in den Exsikkator gebracht. Allmählich schieden sich aus dem Peptongemische Kristalle aus, welche nach Entfärbung mit Tierkohle aus Wasser umkristallisiert wurden. Sie schmolzen zwischen 178 und 182° und zeigten alle die für Bernsteinsäure charakteristischen Reaktionen. Eine Charakterisierung der anderen, neben der Bernsteinsäure vorhandenen organischen Säuren wurde nicht vorgenommen.

In einer zweiten Käseprobe, die zunächst genau so behandelt wurde, wie es soeben beschrieben worden ist, fällten wir nach Abscheidung des Caseoglutins mit Bleiacetat und im Filtrat des dabei entstandenen Niederschlages mit Bleiessig. Da die organischen Säuren entweder ganz oder doch zum größten Teil erst von Bleiessig gefällt werden, so gelingt auf solche Weise von vornherein ihre Trennung von der Hauptmenge der Peptone. Diese wurden aus dem Bleiacetatniederschlage nach Beseitigung des Bleis in Form einer gelblich teigigen Masse erhalten, die sich auf einer Tonplatte leicht trocknen ließ. Der Eiweißstoff gab die *Millon*sche Reaktion, aber nicht die Tryptophanreaktion. Schwefel war nicht vorhanden. 15 g der Peptonmasse wurden mit 15proz. Schwefelsäure 8 Stunden lang gekocht. Nach dem Abfiltrieren wurde so viel Schwefelsäure zugegeben, daß die Flüssigkeit 5 Proz. davon enthielt und mit Phosphorwolframsäure gefällt, der Niederschlag abgenutscht, die Basen mittels Baryts freigemacht, das Ammoniak durch Einleiten von Luft vertrieben, das Barium mit Kohlensäure gefällt und die Lösung mit Kohlensäure übersättigt. Sublimat ergab eine Fällung von Histidinquecksilber. Im Filtrat davon bewirkte *Brückes* Reagens eine Trübung, *Nesslers* Reagens eine Fällung. Somit ist auch Arginin vorhanden.

Die Menge des Bleiessigniederschlages war natürlich jetzt erheblich geringer. Das auf dem Wasserbade zur Trockne eingedampfte Filtrat von Schwefelblei war schwarz gefärbt, offenbar infolge der Anwesenheit von Phosphorsäure. Aus dem Ätherauszug ließen sich die organischen Säuren in Form gut ausgebildeter Kristalle erhalten.

Zur Prüfung auf Basen wurden 5 kg frischen, fein zerriebenen Magerkäsepulvers dreimal mit je 15 Litern heißen Wassers extrahiert, dabei jedesmal gut ausgepreßt, in den vereinigten Extrakten nacheinander mit Bleiacetat, Bleiessig und Phosphorwolframsäure in der bekannten Weise gefällt, und die Ausbeute an Basen und diesmal auch der Gehalt an durch Phosphorwolframsäure fällbaren Stickstoff bestimmt. Letzterer betrug

bei der qualitativen Untersuchung, d. h. bei der Stickstoffbestimmung in einem aliquoten Teile des Basengemisches 0,12 Proz., der bei der quantitativen Analyse gefundene 0,18 Proz. Die Menge der gravimetrisch bestimmten Basen belief sich auf 0,57 Proz. Die Ausbeute ist somit erheblich besser als bei dem vorher untersuchten Magerkäse, und beide Versuche zeigen, welche wichtige Rolle die Art und Weise der Extraktion und die dabei verwendete Menge Wasser spielen.

Die Trennung der Basen und die Abscheidung der Aminosäuren geschah in bekannter Weise. Das schließlich erhaltene Aminosäurengemisch wurde nach *E. Fischer* verestert und die Ester der fraktionierten Destillation unterworfen.

Nachfolgende Tabelle zeigt die Zahlen der bei dem Drucke von 14 mm und verschiedenen Temperaturen erreichten Ausbeuten der einzelnen Fraktionen:

Fraktion	Temperatur °C	Menge g
1.	30—55	6,9
2.	55—90	7,6
3.	90—110	9,1
4.	110—140	6,2
5.	140—165	3,7

Im Kolben blieben 11 g zurück.

Auf die gleiche Art wurden noch zwei weitere Veresterungen vorgenommen. Die Aufarbeitung geschah in allen Fällen in gleicher Weise. Die einzelnen Fraktionen wurden aus Wasser umkristallisiert und in zwei bis drei Kristallfraktionen zerlegt. In allen Fällen gelang die Reindarstellung von Valin, Leucin, Isoleucin, Pyrrolidincarbonsäure und Asparaginsäure. Die Mengen der einzelnen erhaltenen Aminosäuren waren bei den drei Versuchen recht verschieden, doch überwog das Leucin in allen Fällen. Bei dem oben beschriebenen Versuche bestand die Fraktion 3 zu 50 Proz. aus Leucin, der Rest hauptsächlich aus Pyrrolidincarbonsäure. Zur Charakteristik wurden die meisten Kristallfraktionen auf ihren Stickstoffgehalt untersucht und der Kupfergehalt des Kupfersalzes bestimmt. Folgendes waren die Resultate:

Esterfraktion 1.

Fraktion 1 wurde nach erfolgter Verseifung stark eingeengt, die sich ausscheidenden Kristalle von der Mutterlauge abgesogen und bei 100° getrocknet. Sie enthielten 12,22 Proz. Stickstoff.

Der nach der N-Bestimmung verbliebene Rest der Kristalle wurde in Wasser gelöst, die Lösung mit ausgewaschenem Kupfercarbonat neutralisiert, vom überschüssigen Kupfersalz abfiltriert, auf ein kleines Volumen eingedunstet, die dabei ausgeschiedenen Kristalle von der Flüssigkeit abgesogen und bei 100° getrocknet. Wir fanden 21,69 Proz. Kupfer. Somit bestand diese Fraktion hauptsächlich aus Valin, allem Anschein nach sogar, wegen des höheren Stickstoffgehalts, mit wenig Alanin verunreinigt.

Die Mutterlauge von der Kristallfraktion 1 wurde weiter eingeengt und in der soeben beschriebenen Weise behandelt. Die dabei erhaltenen Kristalle der Kristallfraktion 2 enthielten 11,87 Proz. N, der Gehalt des Kupfersalzes an Cu betrug 21,38 Proz. Die Zahlen stimmen sehr gut auf Valin.

Esterfraktion 2.

Nach der Verseifung wurde fast zur Trockne eingedampft und der Rückstand mit Alkohol ausgekocht. Aus Wasser auskristallisiert, lieferte Fraktion 1 Kristalle mit 10,05 Proz. Stickstoff. Es lag also nahezu reines Leucin vor. Kristallfraktion 2 wurde mit Kupfercarbonat in das Kupfersalz übergeführt, dieses mit Methylalkohol extrahiert, der Methylalkohol abgedunstet und der Rückstand aus Wasser umkristallisiert. Das so erhaltene Kupfersalz enthielt 21,52 Proz. Kupfer und 9,52 Proz. Stickstoff. Demnach lag reines Valin vor. Die dritte Kristallfraktion besaß einen niedrigeren Stickstoffgehalt; sie bestand offenbar aus viel Valin und Leucin bzw. Isoleucin.

Esterfraktion 3.

Diese Fraktion enthielt hauptsächlich Leucin, welches mit Hilfe von Alkohol von dem Prolin befreit worden war. Die vereinigten Alkoholauszüge wurden eingedunstet, der Rückstand in Wasser gelöst und mit einem Überschuß von Kupferhydroxyd gekocht. Die blaue abfiltrierte Lösung wurde eingedunstet und mit Alkohol ausgezogen. Man filtrierte nun vom Unlöslichen ab, dunstete ein und zersetzte das Kupfersalz mit Schwefelwasserstoff. Die vom Kupfersulfid getrennte Lösung wurde zum Sirup eingeengt, mit Alkohol ausgezogen und der alkoholische Sirup mit Äther versetzt. Die nach langem Stehen gebildeten Kristalle wurden gesammelt und daraus das Kupfersalz hergestellt. Der Kupfergehalt betrug 21,65 Proz. Prolinkupfer enthält 21,39 Proz. Cu. Auch die Kristallfraktion 2 enthielt ziemlich viel, die Fraktion 3 ungefähr 40 Proz. der Gesamtmenge an Prolin. In den Esterfraktionen 1 und 2 wurde ebenfalls Prolin gefunden, allerdings nur in geringer Menge.

Esterfraktion 4 und 5.

Sie wurden mit Äther und Wasser ausgeschüttelt. Die in Wasser löslichen Teile wurden mit Baryt verseift, das Barium mit Schwefelsäure quantitativ entfernt und bis zur Sirupdicke eingedunstet. Die erhaltenen Kristalle besaßen 10,05 Proz. Stickstoff, bestanden demnach hauptsächlich aus Asparaginsäure, daneben war allem Anschein nach noch etwas Glutaminsäure vorhanden.

Nachfolgend mögen nur kurz die Zahlen angegeben werden, die wir bei der Darstellung der Aminosäuren eines anderen Magerkäses erhielten:

	Cu-Gehalt Proz.	N-Gehalt Proz.
Esterfraktion 1		
Kristallfraktion I	21,26	9,29
" II	21,39	9,38
Esterfraktion 2	19,58	10,20
" 3	—	10,58
" 4 und 5	—	8,37

Man sollte eigentlich erwarten, daß es gelänge, unter den Eiweißspaltungsprodukten des Magerkäses auch Tyrosin vorzufinden. Mehrere in dieser Hinsicht unternommene Versuche ergaben aber ein negatives Resultat. In einem Falle wurden 6 kg Magerkäse mit etwa 50 Litern Wasser ausgekocht, im Extrakt mit Bleiessig gefällt und die vom Blei befreite Lösung bis zur Kristallisation eingedunstet. Der nach monatelangem Stehen erhaltene Kristallsirup wurde von der Flüssigkeit durch Absaugen getrennt

und die von Kristallen durchsetzte, schmierige Masse durch Umkristallisieren in mehrere Fraktionen zerlegt. Es gelang nicht, die charakteristischen Kristalle des Tyrosins zu erhalten.

Nach der Vorschrift von *Ehrlich* und *Lange*[1]) bestimmten wir in einem Magerkäse den Gehalt an p-Oxyphenyläthylamin. Ausgehend von 200 g Käse erhielten wir 0,1400 g rohes Aminchlorhydrat, entsprechend 0,1103 g Amin. Der frische Magerkäse enthielt somit weniger als 0,055 Proz. p-Oxyphenyläthylamin.

Untersuchung der nichteiweißartigen Abbauprodukte.

Die Versuche von *Trillat* und *Sauton*[2]) (vgl. Einleitung) über Aldehyde im Käse wurden nachgeprüft, und zwar mit einem Magerkäse und mit Cheddarkäse. Wir destillierten ein Gemisch von 200 g Käsepulver mit 200 ccm Wasser und 20 ccm einer 10proz. Schwefelsäure so lange, bis 50 ccm übergegangen waren. Das Destillat wurde in einem in einer Kältemischung stehenden Erlenmeyerkolben aufgefangen. Bei beiden Käsearten erhielten wir mit Jodkaliumlösung geringe, aber deutliche Jodoformbildung. Das Destillat von Magerkäse ergab mit fuchsinschwefliger Säure allmählich Rotfärbung, doch zeigte ein mit reinem Wasser angestellter Parallelversuch genau die gleiche Erscheinung. In bezug auf das von *Trillat* und *Sauton* vorgeschlagene kolorimetrische Verfahren ist daher Vorsicht geboten. Ammoniakalische Silberlösung gab keine Fällung im Destillat von Magerkäse. Dagegen war diese Reaktion, ebenso wie die mit fuchsinschwefliger Säure bei Cheddarkäse deutlich positiv. Es geben somit Magerkäse und Cheddarkäse mit verdünnter Schwefelsäure erhitzt jodoformbildende Substanzen, aber nur im Cheddarkäse sind Aldehyde vorhanden.

Angeregt durch eine Arbeit von *Adametz* über die Bildung flüchtiger Alkaloide in sterilisierter Magermilch[3]) dampften wir die bei der quantitativen Bestimmung des Ammoniaks im Vakuum gesammelten Destillate auf dem Wasserbade zur Trockne ein, extrahierten mit Alkohol, filtrierten ab, dampften wieder ein und lösten den Rückstand in Wasser. Nicht eine der bekannten Reaktionen zum Nachweis von Alkaloiden fiel positiv aus. Bei einem weiteren Versuche wurden 2 kg Magerkäse mit Wasser und Magnesia bei nicht ganz 100° erhitzt und die übergehenden Dämpfe in Pikrinsäure gesammelt. Das Filtrat wurde in Fraktionen zerlegt, die aber alle nur Ammoniak enthielten.

Zusammenfassung

der wichtigsten Ergebnisse des Teiles vorliegender Arbeit, der sich mit der *Zusammensetzung* des Magerkäses befaßt.

Aus den Tabellen II und III ergeben sich folgende Mittelzahlen:

	Mittlerer Gehalt der frischen Käse an		
	Wasser Proz.	Ätherextrakt Proz.	Asche Proz.
Magerkäse	47,2	5,9	7,4
Emmentaler Fettkäse .	31,2	34,4	3,9

[1]) Diese Zeitschr. 63, 156, 1914.
[2]) C. r. 1907, S. 333.
[3]) Milchw. Zentralbl. 1905, S. 78.

Mittlerer Gehalt der fett-, wasser- und aschenfreien Käsemasse an:

	Gesamtstickstoff	Gesamt-Eiweißstickstoff	Basenstickstoff	Aminosäurestickstoff	Stickstoff der Eiweißabbauprodukte	Ammoniakstickstoff
	Proz.	Proz.	Proz.	Proz.	Proz.	Proz.
Magerkäse .	13,6	12,1	0,59	0,70	1,5	0,22
Fettkäse . .	14,0	11,5	0,59	1,70	2,5	0,12
Magerkäse 7	13,5	10,7	0,17	1,76	2,7	0,65

Der mit 7 bezeichnete Magerkäse war 15 Monate alt und besaß eine von den anderen, nur etwa halb so alten Käsen abweichende Zusammensetzung. Bei Berechnung der Mittelzahlen wurden die Ergebnisse der Analyse dieses Käses nicht mit berücksichtigt.

Beim Vergleiche der Zusammensetzung der Magerkäse mit den Fettkäsen ergibt sich, abgesehen von dem höheren Fettgehalt der letzteren, auch ein niedrigerer Aschen- und Wassergehalt im Fettkäse. Die Magerkäse enthalten durchschnittlich mehr Ammoniak als die Fettkäse.

Sehr charakteristisch ist ferner der wesentlich höhere Reifungsgrad des Fettkäses gegenüber dem Magerkäse, ein Umstand, auf den bereits 1884 *E. Schulze* und seitdem verschiedene andere Forscher hingewiesen haben. Die viel weiter gehende Zersetzung der Eiweißprodukte im Fettkäse zeigt sich insbesondere in der Menge ihrer Aminosäuren, die nach unseren Zahlen etwa ein und einhalb mal so groß ist als bei Magerkäse.

Nach Tabelle III ist die Zusammensetzung der Magerkäse mit der oben erwähnten Ausnahme recht gleichmäßig. Die Zahlen für den Gesamtstickstoffgehalt schwanken zwischen 13,4 und 13,9, die für den Gesamteiweißstickstoff zwischen 11,4 und 12,5. Nur die Zahlen für Basen und für Aminosäuren zeigen, in Anbetracht ihrer geringen Größe, große prozentuale Unterschiede, und zwar liegen bei einem mittleren Gehalte von etwa 0,6 für erstere die Werte zwischen 0,2 und 1,1, für die Aminosäuren zwischen 0,1 und 1,0. Dagegen sind die Zahlen für die Eiweißzersetzungsprodukte wieder etwas gleichmäßiger (1,2 bis 1,9 bei einem mittleren Gehalt von 1,5). Es haben eben die Magerkäse, welche viel durch Phosphorwolframsäure fällbare Verbindungen Basen und Peptide aufweisen, dafür besonders weniger Aminosäuren und umgekehrt. Demnach scheint es, daß sich der Eiweißabbau im Magerkäse bald nach der Seite der Aminosäuren, bald nach derjenigen der Basen vollziehen kann.

Die Zahlen für den Ammoniakstickstoff sind bei den einzelnen Magerkäsen nicht sehr verschieden, dagegen sind sie durchweg höher als bei den Fettkäsen. Auffallend ist der hohe Ammoniakgehalt des alten Magerkäses Nr. 7.

Auch die qualitative Zusammensetzung des Magerkäses weicht von derjenigen des Fettkäses in mancher Beziehung ab. Zwar scheint bei der Reifung von Magerkäse der Eiweißabbau in ähnlicher Weise zu verlaufen wie bei Fettkäse; man findet bei beiden die Spaltungsprodukte Valin, Leucin, Isoleucin, Alanin, Asparaginsäure, Glykokoll, Glutaminsäure, Phenylalanin, Prolin [vgl. *Bissegger* und *Winterstein*[1])]. Während jedoch beim Fettkäse stets das Auftreten von Hexonbasen zu beobachten ist, konnten in zwei von drei Fällen selbst bei Verarbeitung größerer Mengen Magerkäse keine dieser Basen nachgewiesen werden. Der Fettkäse enthält kein Arginin, während wir in einem Magerkäse ganz kleine Mengen davon fanden. Dagegen sind im Magerkäse größere Mengen von Polypeptiden vorhanden, welche bei der Säurespaltung Basen liefern, und daneben enthält er auch die anderen aus Fettkäse isolierten Eiweißkörper: Caseoglutin, Tyroalbumin und Tyrocasein

[1]) Zeitschr. f. phys. Chem. 47, 28, 1905.

Über die Wirkung des Chinins und Atoxyls auf die Nierenlipase.

Von

P. Rona und **H. E. Haas.**

(Aus der chemischen Abteilung des pathologischen Instituts der Universität Berlin.)

(Eingegangen am 14. Juli 1923.)

Mit 14 Abbildungen im Text.

I. In den vorhergehenden Arbeiten war es gelungen, auf dem Wege der „Giftanalyse“ charakteristische Unterscheidungsmerkmale zwischen der Lipase des Serums, der Leber und des Pankreas zu finden. Der Verlauf der Untersuchungen und die klinische Beobachtung, daß bei Nierenkranken im Blute und im Urin normalerweise nicht vorhandene Lipasen auftreten, führten zu unserer Fragestellung: Hat die Niere eine eigene Lipase und läßt sich diese durch Giftanalyse von der Blutlipase und von anderen Lipasen unterscheiden ?

Die Feststellung der Lipase erfolgte durch die Beobachtung der Spaltung einer gesättigten Tributyrinlösung, gemessen an der Veränderung der Oberflächenspannung. Die Spaltung wurde stalagmometrisch nach der Methode von *Rona* und *Michaelis* bei Zimmertemperatur verfolgt.

Versuchsanordnung: Die frisch exstirpierte Niere eines Tieres, später menschliche Niere, möglichst kurz nach dem Tode entnommen, wurde fein zerhackt, dann mehrfach abgespült, um das anhaftende Blut abzuwaschen; dann wurde eine Niere in etwa 200 ccm Ringerlösung eine halbe Stunde geschüttelt, durch Leinwand filtriert, das Filtrat zentrifugiert und mit Toluol versetzt im Eisschrank aufbewahrt. Der auf diese Weise gewonnene Extrakt war von gelbroter Farbe, milchig trübe und stark eiweißhaltig. Es hielt sich etwa zwei Monate ohne wesentlich an Wirksamkeit einzubüßen.

Zunächst wurde festgestellt, daß der Extrakt ein stark wirksames lipolytisches Ferment enthielt, von derselben Größenordnung der lipolytischen Wirkung, die die gleiche Menge normalen Blutserums entfaltet.

Die Versuchsanordnung war, falls nicht anders erwähnt, folgende: Es wurden gemischt: 25 ccm gesättigte Tributyrinlösung „Tributyrin", 1 ccm m/3 Phosphatpuffer „Puffer", 1 ccm Organextrakt „Lipase". Das Gemisch wurde je nach der Wirksamkeit des Ferments in Abständen von 10 bis 20 Minuten stalagmometrisch geprüft. Nach Ablauf der Spaltung erfolgte elektrometrisch die Bestimmung der H˙-Konzentration.

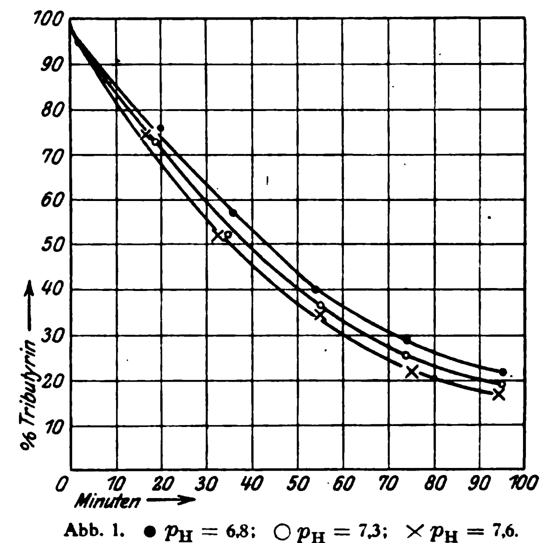


Abb. 1. ● $p_H = 6,8$; ○ $p_H = 7,3$; × $p_H = 7,6$.

Die Wirksamkeit der Lipase zeigt sich, wie bei der Lipase des Serums und der anderen Organe, abhängig von der p_H. Das Optimum der Wirksamkeit liegt etwa zwischen p_H 7 bis p_H 8. Bei wachsender H˙-Konzentration nimmt das Spaltungsvermögen rasch ab, um bei einer H˙-Konzentration von etwa 4,5 fast ganz zu erlöschen. So wurde gefunden:

Vorversuch 1.

p_H = ...	5,61	6,02	6,48	7,0	7,43	7,70
k = ...	0,00172	0,00308	0,00360	0,00616	0,00538	0,00763

Vorversuch 4.

p_H = ...	6,8	7,3	7,5	7,6
k = ...	0,00713	0,00753	0,00818	0,00813

Vorversuch 5.

p_H = .	4,81	5,04	5,14	5,96	6,42	6,84	7,20	7,71
k = .	0,00166	0,00267	0,00416	0,00571	0,00671	0,00811	0,00965	0,00976

Der Verlauf der Spaltung läßt sich mit befriedigender Genauigkeit durch die Formel der monomolekularen Reaktion ausdrücken; z. B. waren im Vorversuch 5 die Werte für k (bei p_H 4,81) nach 62 Min. 0,00169; nach 76 Min. 0,00166; nach 90 Min. 0,00162; für k (bei p_H 5,04) nach 47 Min. 0,00264; nach 59 Min. 0,00278; nach 72 Min. 0,00270; nach 87 Min. 0,00256.

Die Zeiten gleichen Umsatzes verhalten sich umgekehrt wie die Fermentmengen. Verhielten sich z. B. (Vorversuch 9) die Fermentmengen wie 1 : 2, so waren die Werte für k_2 0,00903; k_1 0,00460; (Versuch 5) Fermentmenge 1 : 2 $k_2 = 0,00688$; $k_1 = 0,00334$.

Einmaliges Aufkochen oder einstündiges Erhitzen auf 56° vernichtet die Wirksamkeit des Ferments.

Dialyse in Schleicher-Schüll-Dialysierhülsen führt nach einiger Zeit zu einer geringen Abschwächung des Ferments, vielleicht bedingt durch die Ausfällung von Eiweißkörpern. In der Außenflüssigkeit konnte das Ferment nicht nachgewiesen werden. Es ist also nicht dialysierbar.

Das Ergebnis dieser Vorversuche ist also, daß die Lipase des Nierenextrakts mit der des Serums, der Leber und des Pankreas in einer Anzahl von Eigenschaften völlig übereinstimmt.

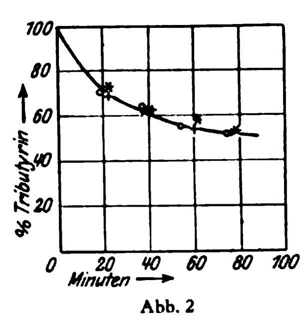


Abb. 2

○ ohne Chinin; + 4,5 mg Chinin; ∗ 9 mg Chinin.

II. Um die Beeinflußbarkeit der Fermentwirkung durch Gifte kennenzulernen, wurde zunächst die Wirkung des Chinin. hydrochlor. geprüft.

Versuchsanordnung: Ferment und Chinin wurden eine halbe Stunde stehengelassen, dann dem gepufferten Tributyrin zugesetzt. Es ist nicht zweckmäßig, gleich das Ferment mit Chinin und mit Puffer zu versetzen, da dann das ausfallende schwer lösliche Chininphosphat die Erscheinungen kompliziert.

Es ergab sich, daß, ebenso wie bei der Leberlipase, das Chinin auch in relativ hoher Konzentration völlig unwirksam auf die Nierenlipase ist. So fanden sich z. B. bei Versuch 1 bei einer Chininkonzentration von 0, 4,5, 9,0 mg die Werte für k 0,00369, 0,00349, 0,00353. Vgl. Abb. 2.

Weiter wurde untersucht, ob diese Chininresistenz eine Eigenschaft des Ferments selbst ist, oder etwa sich abhängig zeigt von dem doch nur annähernd bekannten Medium. Hierzu wurde geprüft, wie sich Nierenextrakt, Blutserum und ein Gemisch zu gleichen Teilen verhielt.

Es ergab sich, daß, wie bei der Leberlipase, ein Gemisch von Serumlipase mit Nierenlipase sich in seiner Wirkung addiert. Mit Chinin versetzt, wird nur die Wirkung der einen Komponente, der Serumlipase, aufgehoben.

Versuchsanordnung: Versuch 3. p_H 6,8. Zunächst wurden drei Versuche ohne Chinin angestellt: a) mit 1 ccm Nierenextrakt; b) mit 1 ccm Serum (entsprechend verdünnt); c) 0,5 ccm Nierenextrakt + 0,5 ccm Serum. Die Spaltung verlief bei a), b) und c) fast gleich; die Werte für k waren 0,00616; 0,00575; 0,00635; dann wurde d) ein Kontrollversuch für das Serum angestellt: 1 ccm Serum + 3 mg Chinin in 1 ccm Wasser. In der Beobachtungszeit (80 Min.) fand keine Spur einer Spaltung statt; die Tropfenzahl blieb unverändert. Jetzt wurden angesetzt: e) 0,5 ccm Nierenextrakt ohne Chinin; f) 0,5 ccm Nierenextrakt + 3 mg Chinin; g) 0,5 ccm Nierenextrakt + 0,5 ccm Serum + 3 mg Chinin. Die Spaltung verlief in e), f) und g) gleich-

mäßig, das Chinin wirkte nur bei g) auf die 0,5 ccm Serumlipase; die Werte für k waren, wie verlangt werden mußte, halb so groß wie bei den Versuchen a), b) und c) 0,003 34; 0,003 37; 0,003 25. Der besseren Übersicht halber sei der Versuch auch tabellarisch dargestellt.

	a	b	c	d	e	f	g	
Nierenextrakt . .	1,0		0,5		0,5	0,5	0,5	
Serum		1,0	0,5	1,0			0,5	
Chinin ($^1/_2$ Std.) . .				1,0		1,0	1,0	1 ccm = 3 mg Chinin
Tributyrin + Puffer.	26,0	26,0	26,0	26,0	26,0	26,0	26,0	
$k = \frac{1}{t} \cdot \log \frac{a}{a-x}$	0,00616	0,00575	0,00635	0	0,00334	0,00337	0,00325	

Versuch 4 wie Versuch 3. p_H 6,71.

$k = \frac{1}{t} \cdot \log \frac{a}{a-x} =$	0,00688	0,00528	0,00594	0	0,00334	0,00320	0,00320

Anschließend erschien es von besonderem Interesse, für klinische Zwecke festzustellen, ob sich etwa die Wirksamkeit des Chinins bzw. das Verhalten der Blut- und Serumlipase ändert, wenn dem System etwas Urin als Medium zugefügt wird.

Versuch 5. p_H 7,54. Versuchsanordnung, ähnlich Versuch 3, ist aus der Tabelle ersichtlich.

	a	b	c	d	e	f	g
Urin . . . . . (½ Std. stehen gelassen)	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
Nierenextrakt. (½ Std. stehen gelassen)	—	1,0		1,0		0,5	0,5 ½ Std. auf 56° erhitzt
Serum . . . . (½ Std. stehen gelassen)	—		1,0		1,0	0,5	0,5
Chinin ($^1/_2$ Std.) . . .	—			1,0	1,0	1,0	
Tributyrin + Puffer .	26,0	26,0	26,0	26,0	26,0		26,0
$k = \frac{1}{t} \cdot \log \frac{a}{a-x}$	0	0,00735	0,00729	0,00711	0	0,00363	0

Wie die Tabelle zeigt, wirkt der Urin an sich nicht spaltend. Das Spaltungsvermögen von Nierenlipase und Serumlipase blieb erhalten, obgleich das Ferment längere Zeit, im ganzen 1 Stunde, mit dem Urin vermischt war. Die Giftempfindlichkeit der Serumlipase bestand auch in diesem Medium, die Nierenlipase war auch hier nicht von dem Chinin angegriffen; das Gemisch von Serum- und Nierenlipase zeigte hier ebenfalls die elektive Vergiftbarkeit der Serumlipase durch das Chinin. g) war eine Kontrolle, die zeigte, daß das unwirksam gemachte Ferment mit dem Urin vermischt, ebenfalls keine Spaltung mehr ausführen konnte.

III. Im zweiten Teile der Giftuntersuchung wurde die Einwirkung des Atoxyls auf die Nierenlipase geprüft.

Es ergab sich, daß schon sehr kleine Dosen, 0,00005 mg Atoxyl (in 28 ccm Gesamtvolumen) einen deutlich hemmenden Einfluß auf

das Ferment ausübt. Die Versuchsanordnung war hier die gleiche wie bei den Chininversuchen: 1 ccm Nierenextrakt, 1 ccm Atoxyllösung, 25 ccm Tributyrin, 1 ccm Puffer.

Zunächst wurde dann der Einfluß der Zeit auf die Vergiftung der Lipase festgestellt. Es zeigte sich bei unserer Versuchsanordnung ein Ansteigen der Giftwirkung in etwa 40 bis 50 Minuten zu einem konstant bleibenden Maximum. Mit Rücksicht auf später folgende Dialyseversuche wurde auch noch besonders beachtet, ob nach längerer Zeit eine „Erholung" der Lipase zu beobachten ist, die einen reversiblen Prozeß vortäuschen könnte. Es ergab sich hierbei, daß auch nach Tagen die einmal gefundene Atoxylwirkung konstant blieb.

Versuch 13. p_H 6,9. Versuchsanordnung: 1 ccm Lipase + 1 ccm Atoxyllösung wurden durch leichtes Schwenken gemischt, dann bei Zimmertemperatur stehengelassen, die Giftwirkung nach verschiedenen Zeiten beobachtet.

Versuch 13. p_H 6,9.

	a	b	c	d	
Lipase	1,0	1,0	1,0	1,0	Zugesetzt zu 25,0 Tributyrin
Atoxyl	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0 Puffer nach
Zeit	3′	10′	25′	45′	
k = ...	0,00935	0,00285	0,00234	0,00230	

Versuch 14 wie Versuch 13. p_H 6,9.

	a	b	c	d
Zeit	25′	40′	55′	70′
k = ...	0,00300	0,00319	0,00264	0,00265

Versuch 27. p_H 6,95.

	a	b
Zeit . . .	1^h	28^h
k = . . .	0,00128	0,00124

Während nun sehr kleine Dosen nach genügend langer Einwirkungszeit schon eine sehr deutliche Hemmung hervorrufen, ergab sich, daß eine vollständige oder fast vollständige Vergiftung erst durch relativ sehr große Dosen erfolgt, die etwa dem 10000fachen der kleinsten deutlich hemmenden Menge entspricht. Es fanden sich also Verhältnisse, die zunächst denen der Atoxylwirkung bei der Serum- und Leberlipase ganz zu entsprechen schienen. Die Abhängigkeit der Hemmung des Ferments von der Giftkonzentration zeigte uns aber, daß der Vergiftungsprozeß prinzipiell doch ein anderer ist. Die Hemmung der Serum- und Leberlipase durch Atoxyl, und auch die der Serum- und

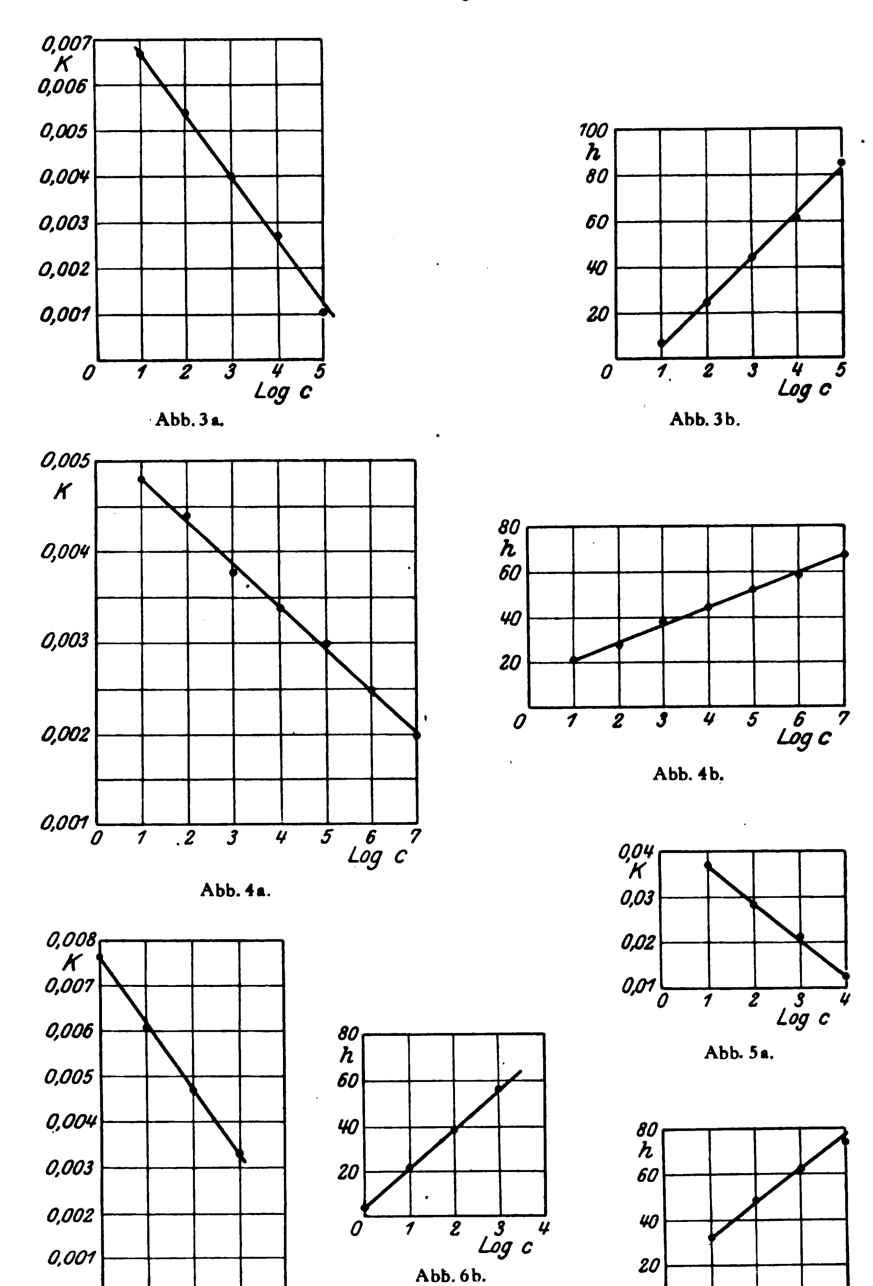


Abb. 3a.

Abb. 3b.

Abb. 4a.

Abb. 4b.

Abb. 5a.

Abb. 6a.

Abb. 6b.

Abb. 5b.

der Pankreaslipase durch Chinin verläuft so, daß bei Zunahme der Giftkonzentration nach einer geometrischen Reihe die Geschwindigkeitskonstanten der Fermentwirkung eine Abnahme nach einer arithmetischen Reihe erfahren. Das gleiche gilt hier für die Hemmungskurve: bei Zunahme der Giftkonzentration nach einer geometrischen Reihe erfolgt eine Zunahme der Hemmung nach einer arithmetischen Reihe. Als Beispiel seien aus früheren Arbeiten einige Kurven der Giftwirkung nebst den zugehörigen Hemmungskurven angeführt. Es bedeutet immer k die Konstante des Spaltungsverlaufs $\left(k = \frac{1}{t} \cdot \log \frac{A}{A - x}\right)$, c die Konzentration des Giftes, h die Hemmung der Fermentwirkung $\left(h = \frac{k_0 - k}{k_0} \cdot 100\right)$ in Prozenten[1]).

Betrachten wir nun den Einfluß des Atoxyls auf die Nierenlipase, so ergibt sich eine andere Gesetzmäßigkeit. Nimmt man als Abszisse den Logarithmus der relativen Giftkonzentration c, als Koordinate die Geschwindigkeitskonstante der Tributyrinspaltung k bzw. die Hemmung h, so finden wir Kurven von der Form, wie sie als Dissoziationskurven schwacher Säuren (oder Basen) bekannt sind. Wir finden hier ähnliche Verhältnisse, wie sie von *Euler* und *Grauberg* für die Vergiftung von Saccharase durch Anilin beschrieben worden sind[2]).

Versuch 7. Menschennierenextrakt. p_H 6,85. Abb. 7a und b.

Nr.	Atoxyl in mg	Relative Giftkonzentration	$k = \frac{1}{t} \cdot \log \frac{A}{A - x}$	$h = \frac{k_0 - k}{k_0} \cdot 100$
1	0	0	0,006 87	0
2	$1,10^{-4}$	1	0,006 59	4
3	$1,10^{-3}$	10	0,005 56	19
4	$1,10^{-2}$	100	0,002 21	67
5	$1,10^{-1}$	1 000	0,000 78	88
6	1	10 000	0,000 68	90

Versuch 18. Menschennierenextrakt. p_H 7,63. Abb. 13a und b.

1	0	0	0,018 84	—
2	0,000 032	1	0,016 84	11
3	0,000 16	5	0,016 30	14
4	0,000 8	25	0,012 31	35
5	0,004	125	0,007 61	65
6	0,02	625	0,004 31	78
7	0,10	3 125	0,003 24	82

1) Abb. 3a, b. *Rona* und *Reinike*, Serumlipase Chinin, diese Zeitschr. 118, 213, 1921. Versuch 3.
Abb. 4a, b. *Rona* und *Bach*, Serumlipase Atoxyl, ebendaselbst 111, 166, 1920. Versuch 4.
Abb. 5a, b. *Rona* und *Pavlović*, Leberlipase Atoxyl, ebendaselbst 130, 225, 1922. Versuch 14.
Abb. 6a, b. *Rona* und *Pavlović*, Pankreaslipase Chinin, ebendaselbst 134, 108, 1922. Versuch 10.

2) *H. Euler* und *O. Grauberg*, Fermentforsch. 4, 29, 1920.

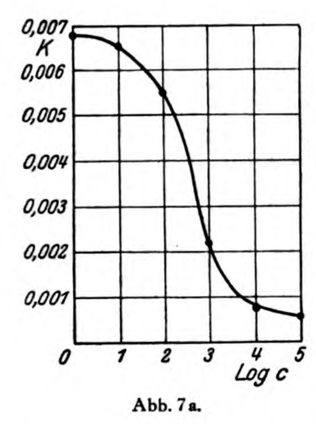


Abb. 7a.

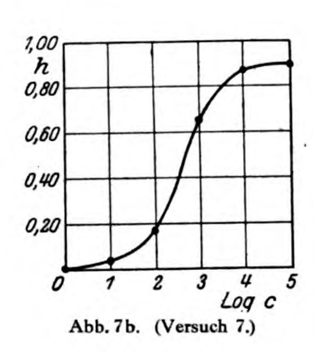


Abb. 7b. (Versuch 7.)



Abb. 8. (Versuch 8.)

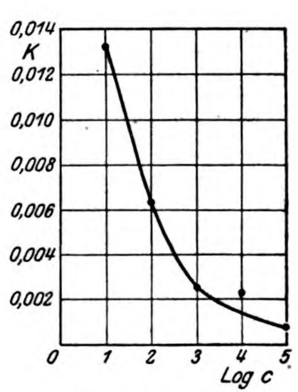


Abb. 9. (Versuch 9.)

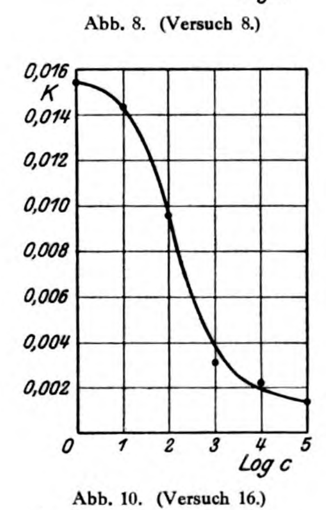


Abb. 10. (Versuch 16.)

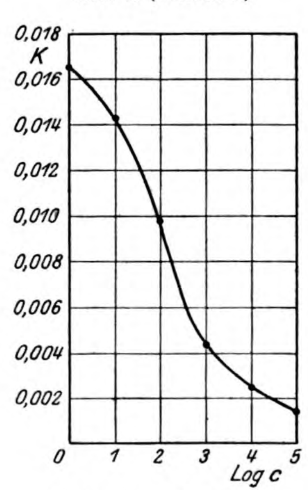


Abb. 11. (Versuch 17.)

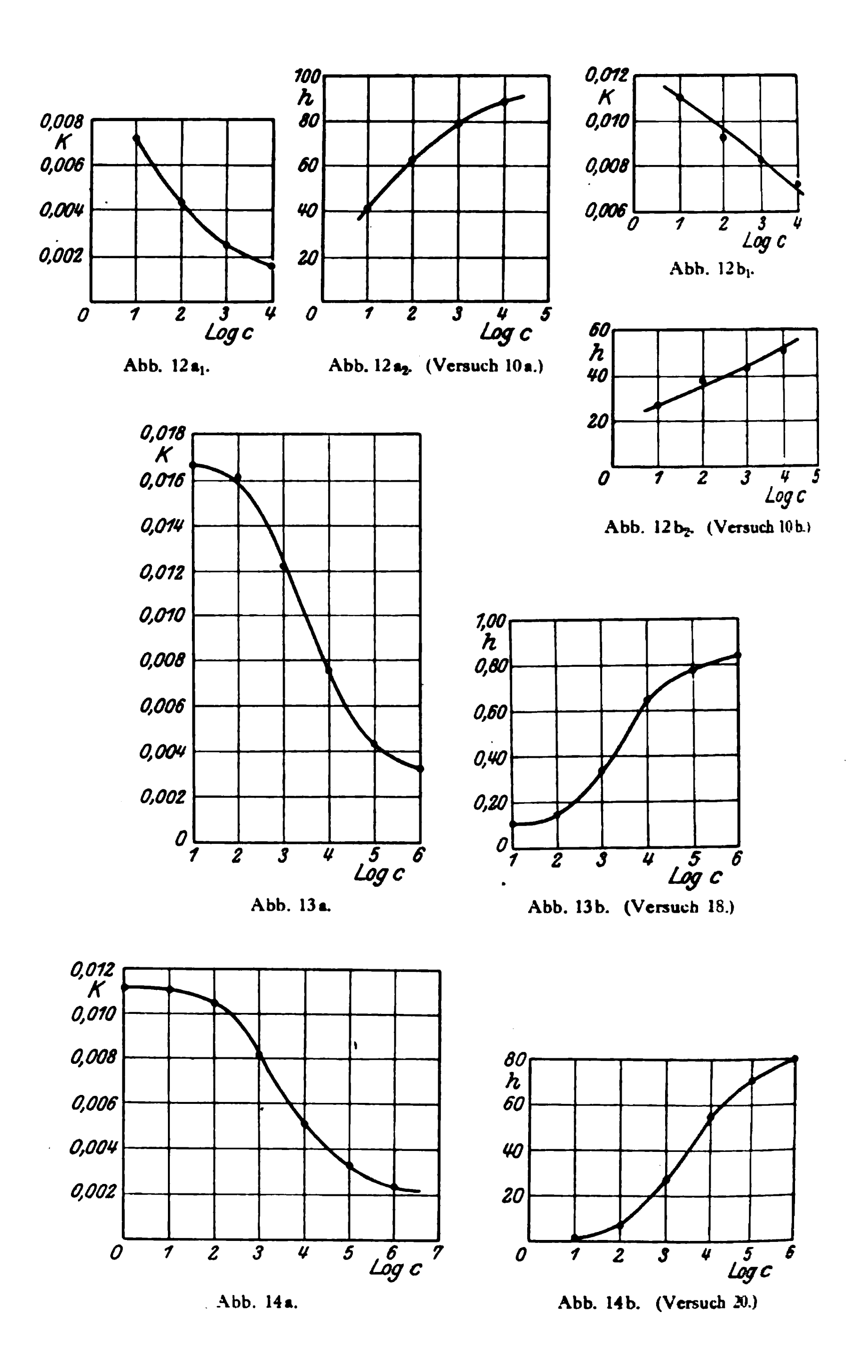


Abb. 12 a_1.

Abb. 12 a_2. (Versuch 10 a.)

Abb. 12 b_1.

Abb. 12 b_2. (Versuch 10 b.)

Abb. 13 a.

Abb. 13 b. (Versuch 18.)

Abb. 14 a.

Abb. 14 b. (Versuch 20.)

Nr.	Atoxyl in mg	Relative Giftkonzentration	$k = \frac{1}{t} \cdot \log \frac{A}{A - x}$	$h = \frac{k_0 - k}{k_0} \cdot 100$
Versuch 22. Menschennierenextrakt. p_H 6,57. Abb. 14a und b.				
1	0	—	0,011 27	—
2	0,000 032	1	0,011 19	—
3	0,000 16	5	0,010 50	7
4	0,000 8	25	0,008 21	28
5	0,004	125	0,005 11	48
6	0,02	625	0,003 29	63
7	0,10	3 125	0,002 27	80
Versuch 8. Menschennierenextrakt. p_H 6,85. Abb. 8.				
1	0	—	0,015 5	—
2	$1,10^{-4}$	1	0,015 5	—
3	$1,10^{-3}$	10	0,011 9	23
4	$1,10^{-2}$	100	0,003 96	74
5	$1,10^{-1}$	1 000	0,002 39	84
6	1	10 000	0,001 15	92
Versuch 9. Menschennierenextrakt. p_H 6,90. Abb. 9.				
1	0	—	0,016 1	—
2	0,001	1	0,013 2	18
3	0,005	5	0,006 33	61
4	0,025	25	0,002 57	85
5	0,125	125	0,002 28	86
6	0,625	625	0,000 85	94
Versuch 16. Menschennierenextrakt. p_H 6,65. Abb. 10.				
1	0	—	0,015 51	—
2	$1,10^{-4}$	1	0,014 48	7
3	$1,10^{-3}$	10	0,009 57	38
4	$1,10^{-2}$	100	0,003 13	79
5	$1,10^{-1}$	1 000	0,002 21	85
6	1	10 000	0,001 32	91
Versuch 17. Menschennierenextrakt. p_H 6,65. Abb. 11.				
1	0	—	0,016 74	—
2	0,001	1	0,014 28	15
3	0,003	3	0,009 84	41
4	0,009	9	0,004 30	67
5	0,027	27	0,002 31	86
6	0,081	81	0,001 42	91

Versuch 10. Abb. 12. ist ein Doppelversuch, er zeigt unter gleichen Versuchsbedingungen (12a) die Wirkung verschiedener Atoxylmengen auf den Nierenextrakt und (12b) auf Leberextrakt. Wegen der relativ geringen Giftbreite erhalten wir nun einen Teil der typischen Kurve bei 12a; bei 12b liegen die k-Werte auf einer Geraden, wie dies von *Rona* und *Pavlović* gefunden wurde.

Versuch 10a. Menschennierenextrakt. p_H 6,90.

Nr.	Atoxyl in mg	Relative Giftkonzentration	$k = \frac{1}{t} \cdot \log \frac{A}{A - x}$	$h = \frac{k_0 - k}{k_0} \cdot 100$
1	0	—	0,012 2	—
2	0,003 12	1	0,007 15	41
3	0,006 25	2	0,004 37	64
4	0,012 5	4	0,002 46	80
5	0,025	8	0,001 70	89

Versuch 10b. Menschenleberextrakt. p_H 6,90.

Nr.	Atoxyl in mg	Relative Giftkonzentration	$k = \frac{1}{t} \cdot \log \frac{A}{A - x}$	$h = \frac{k_0 - k}{k_0} \cdot 100$
1	0	—	0,015 0	—
2	0,003 12	1	0,011 0	27
3	0,006 25	2	0,009 25	38
4	0,012 5	4	0,008 39	44
5	0,025	8	0,007 30	51

IV. Um weiteres über den Vergiftungsvorgang zu erfahren, war es unsere Aufgabe zu prüfen, ob die Vergiftung reversibel oder irreversibel sei. Es wurden hierzu Dialysierversuche angestellt.

In Schleicher-Schüll-Dialysierhülsen wurden einige Kubikzentimeter Extrakt mit Toluol überschichtet und 48 Stunden gegen fließendes Wasser dialysiert, nachdem sie mit einer mittelstarken Atoxylmenge versetzt waren. Nach 1, 24 und 48 Stunden wurden Proben des Gemischs auf ihr Spaltungsvermögen nach der oben angegebenen Versuchsanordnung untersucht. Gleichzeitig wurden zur Kontrolle Extrakte ohne Atoxylzusatz ebenso behandelt.

Versuch 24.

Nr.		Nach 1 h	Nach 24 h	Nach 48 h
1	Nierenextrakt . . . . . $k =$	0,008 79	0,008 65	0,008 40
2	Extrakt + Atoxyl . . . $k =$	0,001 59	0,003 47	0,003 45

Versuch 26.

Nr.		Nach 1 h	Nach 24 h	Nach 48 h
1	Nierenextrakt . . . . . $k =$	0,008 25	0,007 44	—
2	Nierenextrakt + Atoxyl $k =$	0,001 56	0,001 63	0,003 80

Versuch 27.

Nr.		Nach 1 h	Nach 48 h
1	Nierenextrakt . . . . $k =$	0,006 35	0,005 17
2	Nierenextrakt + Atoxyl . . . . $k =$	0,001 27	0,002 33
3	Nierenextrakt + Atoxyl ohne Dialyse $k =$	0,001 28	0,001 22

Wie die Versuche zeigen, wird durch die Dialyse die Wirksamkeit der Lipase fast nicht beeinflußt. Die Hemmung durch das Atoxyl wird deutlich abgeschwächt. Die Vergiftung der Nierenlipase durch das Atoxyl ist also ein reversibler Prozeß. Eine völlige Aufhebung

der Atoxylvergiftung ließ sich nicht erzielen. Es ist wohl anzunehmen, daß sich die Atoxyl-Fermentverbindung sekundär noch weiter verändert, wie ja das ganze Gemisch durch den Dialysiervorgang chemisch und physikalisch-chemisch eine Veränderung erleidet. Versuch 27 zeigt noch in der Kontrolle 3, daß die Atoxylwirkung nach 48 Stunden ohne Dialyse sich nicht verändert.

V. In Hinblick auf eine eventuelle klinische Verwertbarkeit wurde darauf versucht, einen Unterschied der Leber- und Nierenlipase im Blutserum zu finden. Ein Versuch, in chininvergiftetem Serum aus den Vergiftungskurven die entsprechende Lipase zu identifizieren, führte unerwartet zu einem anderen Wege. Es zeigte sich, daß die (atoxylempfindliche) Leberlipase im Gemisch mit Blutserum gegen die Atoxylvergiftung fast völlig unempfindlich wird, während die Nierenlipase ihre normale Empfindlichkeit fast vollständig beibehält. Die entgiftende Wirkung des Serums auf die Atoxylvergiftung der Leberlipase geht sogar so weit, daß auch schon die vergiftete Leberlipase durch Serumzusatz wieder ihre fermentative Wirkung weitgehend zurückerhält.

Die Versuchsanordnung, im wesentlichen die gleiche wie bei den obigen Versuchen, ergibt sich aus der Tabelle.

Versuch 33 und 34 zeigt die Wirkung verschiedener Serummengen auf die Atoxylvergiftung der Leberlipase. Wie aus der Tabelle hervorgeht, genügen schon sehr kleine Mengen, die Atoxylvergiftung deutlich zu hemmen.

Versuch 33. Menschenleberextrakt. p_H 6,90.

	1	2	3	4	5	6
Leberextrakt .	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	— Untersucht nach 1 h
Serum	1,0	0,5	0,25	—		1,0
Atoxyl in mg .	0,5	0,5	0,5	0,5	—	—
Tributyrin + Puffer	36,0	36,0	36,0	36,0	36,0	36,0
$k = \frac{1}{t} \cdot \log \frac{A}{A-x}$	0,02899	0,02670	0,02072	0,00875	0,02911	0,00810
$h = \frac{k_0 - k}{k_0} \cdot 100$	4	8	28	69	—	—

Versuch 34. Menschenleberextrakt. p_H 6,90.

	1	2	3	4	5	6
Leberextrakt .	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Serum	1,0	0,5	0,25	0,125	—	—
Atoxyl in mg .	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	
Tributyrin + Puffer	36,0	36,0	36,0	36,0	36,0	36,0
k = . .	0,01532	0,01452	0,01342	0,00693	0,00313	0,01926
Proz. h = . .	20	25	30	64	83	—

Der folgende Versuch zeigt, daß der Zusatz von Serum zu schon vergifteter Leberlipase die Vergiftung wieder teilweise aufhebt. Der Versuch wurde so angesetzt, daß 1 bis 4 wie immer nach 1 Stunde Atoxylvergiftung untersucht wurden; 5 wurde 30 Minuten mit Atoxyl stehengelassen, dann mit Serum versetzt und nach weiteren 30 Minuten untersucht.

Versuch 40. Menschenleberextrakt. p_H 6,90.

	1	2	3	4	5
Leberextrakt	1,0	1,0		1,0	1,0 } + 1,0 Serum nach 30'
Serum			1,0	1,0	
Atoxyl in mg		1,0	1,0	1,0	1,0
Tributyrin + Puffer .	36,0	36,0	36,0	36,0	36,0
k —	0,03432	0,00672	0	0,02315	0,01191
h = ...	—	80	100	32	65

Wir sehen hier, daß die Leberlipase bei 2 zu 80 Proz. Wirksamkeit gehemmt ist; bei 4 im Gemisch mit Serum hemmt das Atoxyl nur 32 Proz.; bei 5, wo zu dem wie 2 vergifteten Ferment nachträglich Serum zugesetzt wird, beträgt die Hemmung nicht mehr 80 Proz., sondern nur noch 65 Proz.

Unter den hier gezeigten Bedingungen ist also, entgegen früheren Annahmen, die Atoxylvergiftung der Leberlipase ein reversibler Vorgang.

In den nächsten Versuchen wird vergleichend gezeigt: bei 1 bis 6, daß, wie bekannt, 1 mg Atoxyl auf Leber-, Nieren- oder Serumlipase stark hemmend wirkt, 7 zeigt nochmals, daß das Gemisch Leberextrakt-Serum die Leberlipase fast unvergiftet läßt; 8 zeigt das Verhalten eines Gemisches von Nierenlipase-Serum. Wie die Tabellen zeigen, wird dieses Gemisch im Gegensatz zu 7 fast ebenso stark vergiftet wie der reine Extrakt. Um die Versuche eindeutig zu machen, wurde immer nur Serum benutzt, das selbst nur noch sehr wenig lipolytisch wirksam war. Die Versuchsanordnung der drei Versuche ist die gleiche.

	1	2	3	4	5	6	7	8
Leberextrakt . . .	1,0			1,0			1,0	
Nierenextrakt . . .		1,0			1,0			1,0
Serum			1,0			1,0	1,0	1,0
Atoxyl in mg . . .	—	—	—	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Ringerlösung . . .	2,0	2,0	2,0	1,0	1,0	1,0	—	—
Tributyrin + Puffer .	36,0	36,0	36,0	36,0	36,0	36,0	36,0	36,0
Versuch 30; p_H = 6,87 k = . .	0,02064	0,00586	0,00649	0,00245	0,0	0,00215 (?)	0,01731	0,00172
h = . .				88 Proz.	100 Proz.	51 Proz. (?)	16 Proz.	64 Proz.
Versuch 31; p_H = 6,92 k = . .	0,01709	0,00953	0,00556	0,00410	0,00091	0,00072	0,01626	0,00194
h = . .				76 Proz.	90 Proz.	87 Proz.	5 Proz.	39 Proz.
Versuch 32; p_H = 6,92 k = . .	0,02655	0,00760	0,00531	0,00356	0,00037	0,00024	0,01937	0,00175
h = . .				86 Proz.	95 Proz.	95 Proz.	27 Proz.	77 Proz.

Angedeutet ist die giftablenkende Wirkung des Serums auch bei der Nierenlipase; sie ist jedoch sehr viel geringer als bei der Leberlipase.

Die Ablenkung der Giftempfindlichkeit der Leberlipase durch das Serum hat insofern besondere Bedeutung, daß die Pankreaslipase, die nach den bisherigen Befunden allein für Atoxyl unempfindlich gehalten wurde, nun im Serum diese Eigenschaft mit der Leberlipase gemeinsam hat.

Die Unterscheidungsmerkmale genügen zur Erkennung der Fermente unter den angegebenen Versuchsbedingungen. Wieweit sich klinisch die Resultate bestätigen und verwerten lassen, läßt sich noch nicht angeben. Untersuchungen hierüber sind schon im Gange.

Zusammenfassung.

1. Die Niere enthält ein lipolytisches Ferment, dessen allgemeine Eigenschaften mit denen der Blutserumlipase identisch sind.

2. Die Wirksamkeit wurde an der Tributyrinspaltung geprüft; das Wirkungsoptimum liegt bereits zwischen einer p_H von 7 bis 8.

3. Der Spaltungsverlauf läßt sich durch die Formel der monomolekularen Reaktion darstellen.

4. Gegen Chinin ist die Nierenextraktlipase völlig unempfindlich, auch in dem Gemisch Nierenlipase-Serum und in dem Gemisch Nierenlipase-Serum-Urin.

5. Gegen Atoxyl ist die Nierenlipase sehr empfindlich; schon 0,00005 mg in 28 ccm Gesamtvolumen haben eine sicher nachweisbare hemmende Wirkung. Die Vergiftung erreicht in etwa 1 Stunde ihre volle Wirkung.

6. Im Gegensatz zu den bisher untersuchten Lipasen findet sich bei der Vergiftung folgende Gesetzmäßigkeit:

Trägt man den Logarithmus der Atoxylkonzentration auf die Abszisse, den Logarithmus der Spaltungskonstanten oder der Hemmung auf die Ordinate eines Koordinatenkreuzes, so ergibt sich eine Kurve von der Form der Dissoziationskurve.

7. Die Vergiftung der Nierenlipase ist ein reversibler Vorgang.

8. Mischt man 1 ccm Leberextrakt mit 1 ccm Serum, wird die Leberlipase resistent gegen die Atoxylvergiftung; mischt man 1 ccm Nierenextrakt mit 1 ccm Serum, so bleibt die Atoxylempfindlichkeit der Nierenlipase fast vollständig bestehen.

9. Durch Zusatz von Serum wird auch atoxylvergiftete Leberlipase wieder teilweise wirksam. Die Vergiftung der Leberlipase durch Atoxyl ist demnach nicht, wie auf Grund einer anderen Versuchsanordnung angenommen wurde, ein irreversibler, sondern ein reversibler Prozeß.

10. Das Verhalten der Nierenlipase gegen Chinin und Atoxyl ist für die Nierenlipase demnach charakteristisch und ermöglicht eine sichere Unterscheidung von den übrigen, bisher genauer untersuchten Lipasen.

Über ein jodometrisches Bestimmungsverfahren der Harnsäure im Harne.

Von

Otto Fürth, Josepha Urbach und **Paul Wermer.**

(Aus der chemischen Abteilung des Wiener physiologischen Universitätsinstituts.)

(Eingegangen am 16. Juli 1923.)

1. Einleitung.

Magendi hatte im Jahre 1853 beobachtet, daß die Blaufärbung der Jodstärke verschwindet, wenn man Harn zu einer Lösung derselben zusetzt. Bereits *Corvisart* (1863) hatte diese Erscheinung auf den Harnsäuregehalt des Harns bezogen und den Vorschlag gemacht, dieselbe zur Grundlage einer maßanalytischen Bestimmung der Harnsäure zu machen. Seitdem ist das *Jodbindungsvermögen des Harns* erst von einer ganzen Reihe älterer französischer Autoren[1]) und später noch vielfach untersucht worden. Auf eine detaillierte Wiedergabe der einschlägigen Literatur[2]) kann hier um so leichter verzichtet werden, als dieselbe nicht allzuviel Positives zutage gefördert und als diese Jodbindung die mannigfachsten Deutungen erfahren hat. Was uns hier von den Ergebnissen interessiert, ist in Kürze etwa folgendes: Am Jodbindungsvermögen des Harns ist zweifellos als ein wesentlicher Faktor die *Harnsäure* beteiligt. Daneben enthält der Harn aber noch zahlreiche andere, an seinem Jodbindungsvermögen beteiligte Substanzen, derart, daß die Versuche, die Harnsäure etwa durch ein-

---

[1]) Ausführlich referiert in Schmidts Jahrb. **120**, 13 bis 16, 1863.

[2]) *M. Huppert*, Arch. f. Heilk. **5**, 325, 1864. — *A. Jolles*, Wien. med. Wochenschr. 1890, Nr. 16. — *Raphael*, Arb. a. d. pharm. Inst. Dorpat **10**, 149, 1894. — *K. E. Marung*, Inaug. Diss. Dorpat 1900; Jahresber. f. Tierchem. **30**, 360, 1900. — *K. Walko*, Zeitschr. f. Heilk. **21**, 1900. — *J. Ruhemann*, Berl. klin. Wochenschr. **39**, 27, 55, 1902. — *P. P. Pizzorno, D. Vitali, T. Gigli*, Boll. chim. farm. **50**, 51; Chem. Centralbl. 1911, IV, S. 1066, 1067; 1912, III, S. 65. — *C. S. Reichardt*, The Analyst. **36**, 540, 1911; Chem. Centralbl. 1912, I, S. 95. — *H. Caron*, Ann. chim. anal. **17**, 123, 1912; Chem. Centralbl. 1912, III, S. 65. — *O. Weltmann*, Wien. Arch. f. innere Med. **2**, 106, 1920. — *E. Vaillant*, Ann. chim. anal. appl. (2) **4**, 178, 1922; Chem. Centralbl. 1922, IV, S. 1160. — *P. M. Polleri*, Pathologica **14**, 270, 1922; Ber. f. d. ges. Phys. **14**, 173, 1922. — *Leulier*, Arch. de Med. **75**, 498, 1920; Ber. f. d. ges. Phys. **13**, 335, 1922. — *W. Nyiri*, Die Thiosulfatprobe, S. 32 ff. F. Deuticke, 1923.

fache Ermittlung des Jodbindungsvermögens auszuwerten, von vornherein aussichtslos erscheinen mußten. Über die Natur der anderen jodbindenden Substanzen gehen die Meinungen verschiedener Autoren, je nach der Art der angewandten Untersuchungsmethoden, vielfach auseinander. Es scheinen unter Umständen hier in Betracht zu kommen: Alkalien (Ammoniak und Ammoniumcarbonat, Alkaliphosphate und Carbonate), Schwefelwasserstoff und Mercaptane, Purinbasen, Kreatinin, Tyrosin und vielleicht auch andere Aminosäuren, Urochrom bzw. Urochromogen, Urobilin, Bilirubin, Gallensäuren, Dioxyphenole, vielleicht auch Phenole, Acetessigsäure und β-Oxybuttersäure, etwa auch eiweißartige Substanzen und Zucker[1]). Auf eine Diskussion der „*Jodzahl*" des Harns kann angesichts der Undurchsichtigkeit der vorliegenden Verhältnisse hier füglich verzichtet werden.

Weit aussichtsvoller erscheint dagegen der Versuch, die Harnsäure *nach vorausgegangener Abtrennung derselben aus dem Harn* quantitativ zu bestimmen.

M. Huppert[2]) fand bei Einwirkung einer alkoholischen Jodlösung auf Harnsäure in Alkaliphosphatlösung, daß 1 Äquivalent Ur 2 Äquivalente Jod zu binden vermag. *J. Ruhemann*[2]) dagegen fand, als er zu einer abgemessenen Jodjodkaliumlösung Harnsäurelösung zufließen ließ und den vollständigen Jodverbrauch mit Schwefelkohlenstoff als Indikator feststellte, daß 0,0128 g Harnsäure 0,010 g Jod bindet, was nur der Relation von ungefähr 1 Mol. Ur : 1 Atom Jod entspricht.

In systematischer Weise hat *Kreidl*[3]) in *Adolf Liebens* Laboratorium das *Jodbindungsvermögen der Harnsäure* studiert. Der zu bestimmenden Ur-Lösung wurde ein mäßiger Überschuß von n/1 KOH zugefügt und nunmehr Jodlösung aus einer Bürette bis zum Eintreten schwacher Gelbfärbung zufließen gelassen. Sogleich oder nach $^3/_4$ stündigem Stehen wurde HCl hinzugefügt, und zwar mehr als dem vorhandenen KOH entsprach.

Das so in Freiheit gesetzte Jod wurde mit Thiosulfat (Stärke als Indikator) zurücktitriert. Es ergab sich, daß 1 Mol. Ur bei sofortiger Titration im Mittel 3,5 Atome Jod verbrauchte. Wurde aber erst nach $^3/_4$ Stunden titriert, so erschien der Jodverbrauch auffallenderweise nicht größer, sondern kleiner, nämlich nur 2,3 Atome Jod. „Man kann auf diese Art", sagt der Autor, „die kleinsten Mengen Harnsäure bestimmen und ist, wie durch zahlreiche Versuche bestätigt wurde, ganz unabhängig vom Grade der Verdünnung."

Es wurden so wiedergefunden:

statt	0,0175	0,0595	0,0651	0,0922	0,098 g	Harnsäure
	0,0175	0,0594	0,0645	0,0919	0,098 g	„

---

[1]) Jod in jodalkalischer Lösung oxydiert Glucose zu Gluconsäure. *F. A. Cajori*, Journ. of biol. Chem. **54**, 617, 1923.

[2]) *M. Huppert*, Arch. f. Heilk. **5**, 325, 1864. — *J. Ruhemann*, Berl. klin. Wochenschr. **39**, 27, 55, 1902.

[3]) *J. Kreidl*, Sitzungsber. d. Akad. d. Wissensch. Wien, **102**, IIb, S. 93, **1893**.

Die sonderbare Tatsache, daß bei längerer Einwirkung der Jodlösung auf die Harnsäure weniger Jod verbraucht wird, ist von *A. Jolles*[1]) bestätigt und in dem Sinne erklärt worden, daß, wenn man die Flüssigkeit lange Zeit stehenläßt, sich infolge der *Wechselwirkung des harnsauren Alkalis und des Jodkaliums* neues Jod abscheidet. Da dieses Jod aber auch zurücktitriert werden muß, ergibt sich ein scheinbarer Minderverbrauch von Jod. Aus den Zahlen von *Jolles* ergibt sich bei Einwirkung von Jodjodkalium bzw. *Hübl*scher Jodlösung auf Harnsäure eine Jodaufnahme von 1,8 bis 2,4 Atomen Jod pro Molekül Ur.

Nach Untersuchungen, die *E. Bryk*[2]) im Laboratorium *A. Liebens* ausgeführt hat, hängt die Art der Einwirkung des Jods auf alkalische Harnsäurelösungen stark von der Menge der in Reaktion tretenden Komponenten, außerdem aber noch von der Temperatur ab. Die Reaktion soll nach dem Grundschema:

$$2\,KOH + J_2 = 2\,KJ + H_2O + O$$
$$C_5H_4N_4O_3 + H_2O + O = C_4H_6N_4O_3 + CO_2$$

dann erfolgen, wenn man etwa auf 1 Mol. Ur je 2 Atome J und 4 Mol. KOH anwendet. Doch auch unter diesen Umständen wurden Allantoin und CO_2 nur in einer Ausbeute von 40 bis 50 Proz. erhalten.

Nach *A. Ronchèse*[3]) wird die Harnsäure durch Jod in alkalischen Medien (Borax, Kalium oder Ammoniumbicarbonat) bei gewöhnlicher Temperatur in regelmäßiger Weise oxydiert, wobei ein Jodverbrauch von 2 Atomen Jod pro Molekül Ur in Rechnung gestellt wurde.

Auch *D. Vitali*[4]) nahm die Einwirkung von 2 Atomen Jod auf 1 Mol. Ur an. Dieselbe soll jedoch, wenn man z. B. Jod zu einer Lösung von Kaliumurat hinzufügt sich nach der Gleichung:

$$C_5H_4N_4O_3 + 2\,J + 2\,H_2O = CO\begin{matrix}\diagup NH_2\\ \diagdown NH_2\end{matrix} + CO\begin{matrix}\diagup NH-CO\\ \\ \diagdown NH-CO\end{matrix}\!\!\!\!\!\!\!\!\!\!\begin{matrix}|\\CO\\|\end{matrix} + 2\,HJ$$

unter Bildung von Harnstoff und Alloxan erfolgen [welches unter Umständen weiteren Umgestaltungen zu Alloxanthin bzw. Murexid unterliegen kann[5])].

Der Gesamtheit der vorliegenden, alles andere eher als durchsichtigen Literaturangaben können wir so viel entnehmen, daß die Einwirkung von Jod auf Harnsäure ein komplizierter und je nach den Versuchsbedingungen sehr variabler Vorgang ist, der sich aber unter

[1]) *A. Jolles*, Zeitschr. f. phys. Chem. **29**, 193, 1900.

[2]) *E. Bryk*, Monatsh. f. Chem. **15**, 519, Sitzungsber. d. Akad. d. Wiss. Wien **53**, IIb, S. 459, 1894.

[3]) *A. Ronchèse*, C. r. Soc. Biol. 1906, S. 504; Jahresber. d. Tierchem. **36**, 308, 1906.

[4]) *D. Vitali*, Boll. chim. farm. **37**, 65; Chem. Centralbl. 1898, I, S. 665.

[5]) Bezüglich der Oxydation von Harnsäure durch Jodsäure und der titrimetrischen Bestimmung des dabei auftretenden Jods vgl. *H. Bouillet*, Bull. Soc. Chem. Paris (3) **25**, 251; Chem. Centralbl. 1901, I, S. 798. Mit Hilfe des Umstandes, daß Acetessigester Jod bindet und dasselbe der blauen Jodstärke entzieht, versuchte kürzlich *E. Riegler* eine „chronometrische Harnsäurebestimmung" zu begründen. C. r. Soc. Biol. **87**, 291, 1922; Ber. d. ges. Physiol. **15**, 422, 1922. Vgl. auch *A. Archetti*, Boll. chim. farm. **43**, 394; Chem. Centralbl. 1904, II, S. 318.

strenger Einhaltung *bestimmter* Versuchsbedingungen anscheinend in konstanter und wohldefinierter Form vollziehen kann. Der Versuch, die Harnsäure des Harns nach Abtrennung derselben von den anderen Harnbestandteilen einem jodometrischen Bestimmungsverfahren zu unterwerfen, erschien also von vornherein keineswegs aussichtslos, und es ergab sich nun die Frage, ob es gelingt, die Versuchsbedingungen praktisch so zu gestalten, daß die bequeme und sichere Handhabung einer derartigen Methode ermöglicht wird.

2. Jodometrische Bestimmung von Harnsäurelösungen.

Diesem Gedankengange folgend, hat *Ronchèse*[1]) folgendes Verfahren zur Bestimmung der Harnsäure im Harn empfohlen:

100 ccm Harn werden mit Ammoniak und Salmiak versetzt; das abgeschiedene Urat wird nach 1 bis 2 Stunden abfiltriert, mit Wasser, dem NH_3 und NH_4Cl zugesetzt worden ist, gewaschen, in verdünnter Essigsäure gelöst, die Lösung allmählich mit n/10 Jodlösung versetzt, mit Kaliumbicarbonat und Boraxlösung deutlich alkalisch gemacht und mit Thiosulfat (Stärkekleister als Indikator) zurücktitriert. Der Annahme entsprechend, daß 1 Mol. Harnsäure je 2 Mol. Jod zu binden vermöge, wurde die Anzahl verbrauchter Kubikzentimeter n/10 Jodlösung mit 0,084 multipliziert und dann noch als empirische Korrektur 0,01 g hinzuaddiert, um die Gewichtsmenge Harnsäure im Liter Urin zu ermitteln. Die Beleganalysen zeigten befriedigende Übereinstimmung mit den nach der Methode von *Ludwig-Salkowski* gewonnenen Werten.

Wenn dieses Verfahren wenig Beachtung und Anwendung gefunden hat, so mag dies in erster Linie wohl daran liegen, daß die Methode die Verarbeitung einer größeren Harnmenge sowie das zeitraubende Sammeln und Auswaschen des Ammoniumuratniederschlages auf dem Filter erfordert. Hat man sich aber erst einmal den Mühen dieser Prozeduren unterzogen, so kann man ja einfach *nach Hopkins* die Harnsäure durch Kjeldahlisieren des Niederschlages berechnen oder aber dieselbe in bequemer Weise nach *Folin* und *Schaffer* in schwefelsaurer Lösung mit Hilfe von Permanganat titrimetrisch bestimmen.

Es hat sich also darum gehandelt, dem jodometrischen Harnsäurebestimmungsverfahren eine Form zu geben, welche a) die Verarbeitung nur geringer Harnmengen erfordert, b) alle zeitraubenden Filtrations- und Auswaschungsprozeduren überflüssig macht, c) auch mit den einfachsten Laboratoriumshilfsmitteln durchführbar ist, vor allem aber nicht die Anwendung eines Kolorimeters, das ja nicht überall zur Verfügung steht, erfordert, endlich d) chemisch ausreichend fundiert ist, um die (unter verschiedenen Bedingungen ja in sehr verschiedener Weise erfolgende) oxydative Veränderung der Harnsäure durch das in Aktion gelangende Jod in ganz bestimmte Bahnen zu zwingen.

---

[1]) *A. Ronchèse*, Journ. de Pharm. et de Chem. **28**, 336, 1906; Biochem. Centralbl. **5**, 276.

Dazu schien uns nun das vorerwähnte *Kreidl*sche *Verfahren* die geeignetsten Vorbedingungen zu bieten. Die dabei erfolgende *Einwirkung des Jods in statu nascendi* scheint sich in regelmäßigerer Weise zu vollziehen als die Einwirkung des Jods, das in *fertigem Zustande* einer Harnsäurelösung zugefügt wird, in welch letzterem Falle, je nach den Versuchsbedingungen, ein innerhalb ziemlich weiter Grenzen (etwa 1,8 bis 2,5 Atome Jod pro Molekül Harnsäure) schwankender Jodverbrauch beobachtet worden ist. Wir sind daher zunächst daran gegangen, dieses Verfahren von unseren Gesichtspunkten aus einer kritischen Prüfung zu unterziehen.

Wir gingen nun derart vor, daß wir in bekannte Mengen von Harnsäure das Jodbindungsvermögen nach dem Vorgange *Kreidls* ermittelten. Die Harnsäure wurde entweder in Form einer Lösung ihres Lithiumsalzes (0,1 Proz. Harnsäure gelöst in 0,4proz. Lithiumcarbonatlösung) eingeführt, oder aber als solche oder aber als reines harnsaures Ammon (*Kahlbaum*) eingewogen und in einer überschüssigen abgemessenen Menge Li_2CO_3 0,4 Proz., oder n/10 NaOH gelöst.

Wir gingen z. B. derart vor, daß wir eine abgewogene Menge (0,0020 bis 0,0200) Ammoniumurat in 20 ccm n/10 NaOH am Wasserbade lösten, sodann weitere 30 ccm n/10 NaOH, sodann eine mehr als ausreichende Menge n/100 Jodlösung hinzufügten. Es wurde sodann sogleich durch Zusatz von 70 ccm n/10 H_2SO_4 angesäuert, Stärkekleister hinzugefügt und mit n/100 Thiosulfatlösung zurücktitriert.

Wir teilen die Resultate unserer Versuche tabellarisch mit. Die eine Kolonne enthält jene Werte, welche sich ergeben, wenn man die Rechnung entsprechend der *Kreidl*schen Relation (1 Mol. Harnsäure entsprechend 3½ Atomen Jod) durchführt, d. i. 1 ccm n/100 Jod entsprechend 0,00048 g Harnsäure. Die andere Kolonne gibt über die effektiv beobachtete Jodbindung pro Molekül Harnsäure Auskunft. Es wurden so wiedergefunden:

						Effektiver Jodverbrauch pro Molekül Ur-Atome Jod
Statt	0,0100	eingebracht	als	Li-Salz	0,0097	3,39
„	0,0050	„	„	„	0,0051	3,61
„	0,0040	„	„	„	0,0042	3,67
„	0,0030	„	„	„	0,0032	3,82
„	0,0020	„	„	„	0,0021	3,73
„	0,0031	„	„	Ammonsalz	0,0035	3,98
„	0,0009	„	„	„	0,0009	3,50
„	0,0046	„	„	„	0,0048	3,74
„	0,0128	„	„	„	0,0114	3,35
„	0,0180	„	„	„	0,0197	3,81
„	0,0005	„	„	Lithiumsalz	0,0005	3,50
„	0,0006	„	„	„	0,0006	3,50
„	0,0030	„	„	„	0,0030	3,50
„	0,0040	„	„	„	0,0043	3,78
„	0,0050	„	„	„	0,0052	3,67
„	0,0100	„	„	„	0,0101	3,57
„	0,0060	„	„	„	0,0061	3,63
					Mittel . . .	3,62
		Statt der *Kreidl*schen Relation . . .				3,50

Es ergibt sich sonach, *daß unter den angewandten Reaktionsbedingungen die Reaktion tatsächlich so regelmäßig abläuft, daß sehr wohl ein titrimetrisches Bestimmungsverfahren auf dieselbe gegründet werden kann.*

Auch erheblich größere Mengen Harnsäuren, etwa 0,1 g können, wie aus den Zahlen der *Kreidl*schen Abhandlung ersichtlich ist, richtig titriert werden. Nach unten zu bilden etwa 0,0005 g die Grenze, unterhalb deren die Resultate unbrauchbar werden.

Wir haben immer *sogleich, ohne stehenzulassen,* zurücktitriert, da, wie *Jolles* (l. c.) gezeigt hat, bei längerem Stehenlassen der Flüssigkeit die sekundäre Wechselwirkung zwischen dem harnsauren Alkali und dem Jodkalium der Titerflüssigkeit die Versuchsergebnisse fälschen kann.

Die *Gegenwart von Ammonsalzen* stört den Versuch nicht, z. B. eingewogen 0,0089 harnsaures Ammon (= 0,0080 g Ur) titriert nach Zusatz von 1 ccm Ammonsulfat 10 Proz., wiedergefunden 0,0083 g Ur; oder: eingewogen 0,0192 g harnsaures Ammon (= 0,0174 g Ur) titriert nach Zusatz von 2 ccm Ammonsulfat 10 Proz., wiedergefunden 0,0169 g Ur.

3. Jodometrische Bestimmung der Harnsäure im Harne.

1. Abtrennung der Harnsäure als Ammoniumurat.

Zur *Abtrennung der Harnsäure aus dem Harn* haben wir uns nach mannigfachen Vorversuchen für jenen Vorgang entschieden, der von *D. G. Cohen-Tervaert*[1]) im physiologischen Laboratorium in Utrecht für eine Modifikation des kolorimetrischen Verfahrens von *Folin* angegeben worden ist (dasselbe beruht, wie bekannt, auf der Blaufärbung, welche alkalische Harnsäurelösungen mit Phosphorwolframsäure geben).

Wir haben uns durch zahlreiche Versuche von der Brauchbarkeit dieses Verfahrens überzeugt, das uns vielfach zur Kontrolle unseres Vorgangs gute Dienste geleistet hat.

Zunächst haben wir uns durch *Verdünnungsversuche* der als Standardlösung dienenden 0,1 proz. Harnsäurelösung davon überzeugt, daß die Farbenreaktion bei Einhaltung der Vorschriften des Autors der Verdünnung tatsächlich annähernd proportional eintritt. (Verdünnung 1 = 0,1 Proz. Ur.) Es wurde beobachtet:

statt	0,80	0,80	0,60	0,60	0,40	0,40	0,20
	0,84	0,84	0,65	0,59	0,40	0,42	0,26

Weiter wurden wechselnde Mengen der Harnsäure-Standardlösung mit je 2 ccm NH_4Cl (30proz.) versetzt: Es entsteht schnell eine Trübung, später ein sich grobflockig absetzender Niederschlag von Ammoniumurat. Derselbe wurde nach zweistündigem Stehen abzentrifugiert, die überstehende Flüssigkeit abgehoben, 4 ccm einer 10proz. Ammonsulfatlösung hinzugefügt, mit Hilfe eines dünnen Glasstäbchens aufgerührt, sodann wurde 6 bis 10 Minuten lang zentrifugiert. Der Bodensatz wurde nunmehr in 3 ccm lauwarmer 0,4proz. Li_2CO_3-Lösung gelöst, die Lösung in einem 100-ccm-

[1]) *D. G. Cohen Tervaert,* Arch. Néerland. de Physiol. **2**, 337, 1918.

Meßkolben überspült und gut nachgewaschen, dazu 4 ccm *Harnsäurereagens*[1]), 20 ccm Na_2CO_3 (20proz.); Auffüllen auf 100 ccm und Vergleich mit der *Standardlösung*[2]).

Es wurden wiedergefunden:

statt	0,0040	0,0030	0,0020	0,0010	0,0008	0,0006 g Harnsäure
	0,0033	0,0026	0,0020	0,0011	0,0009	0,00044 g „

Weitere Versuche erwiesen ein *Auswaschen* der Ammoniumuratlösung mit Wasser, Alkohol (50proz.) oder gesättigter Natriumsulfatlösung als durchaus untunlich, das Auswaschen mit Ammoniumsulfat (10proz.) dagegen als empfehlenswert.

2 ccm eines Harnes, die nach *Cohen-Tervaert* 0,0010 g Ur enthielten, wurden mit 1 ccm der Standardlösung, enthaltend 0,0010 g Ur, versetzt. Die Ausführung der Bestimmung ergab nun in genauer Übereinstimmung mit dem geforderten Werte 0,0020 g Ur.

2. *Vorgang bei der jodometrischen Harnsäurebestimmung.*

Der Vorgang, der sich uns schließlich als zweckmäßig erwiesen hat, war folgender:

Der frisch gelassene Harn wird durch Zusatz von Natriumcarbonat alkalisch gemacht. 5 ccm desselben werden in ein Zentrifugierglas von etwa 50 ccm Inhalt übertragen, das an seinem unteren Ende zu einem zapfenförmigen Fortsatze von 2½ cm Länge und etwa 7 mm lichter Weite verjüngt ist (die Dimensionen desselben müssen natürlich der Zentrifuge angepaßt sein; wir verwendeten solche von 14 cm Länge und einem Durchmesser von 2½ cm). Es ist wichtig, daß der Übergang zwischen dem weiten und dem verengten Teile steil, nicht stufenförmig abfällt, damit sich der ganze Niederschlag beim Zentrifugieren im zapfenförmigen Ansatz ansammle.

Dazu kommen nun 5 ccm einer 30proz. Ammoniumchloridlösung (also 1,5 g NH_4Cl). Bei zweistündigem Stehen sammelt sich der allmählich ausfallende Ammoniumuratniederschlag im untersten Teile des Gefäßes an. Es wird nun 5 Minuten lang zentrifugiert. Nunmehr wird vom Bodensatze im zapfenförmigen Fortsatz vorsichtig abgegossen oder abpipettiert. Man setzt weiter 5 ccm einer 10proz. Ammonsulfatlösung zu, rührt mit Hilfe eines feinen Glasstäbchens auf und zentrifugiert neuerlich 6 bis 7 Minuten. Die überstehende Ammonsulfatlösung wird von dem festen Niederschlage vorsichtig abgegossen.

---

[1]) *Harnsäurereagens* bereitet nach der Vorschrift *O. Folin* und *A. B. Macallum*, Journ. of biol. Chem. **13**, 363, 1912; „The uric acid reagent is a phosphotungstic acid, prepared by boiling 100 grams of sodiumtungstate with 80 ccm of 85 per cent phosphoric acid and 750 ccm of water for a couple of hours and then diluting to 1 liter."

[2]) *Standardlösung*: 1 ccm 01,proz. Ur-Lösung (= 0,001 Ur) + 4 ccm Harnsäurereagens und 20 ccm Na_2CO_3 (20proz.) auf 100 ccm aufgefüllt (trübt sich meist nach 10 bis 15 Minuten).

Mit Hilfe von 50 ccm n/10 NaOH wird der Niederschlag nach Aufrühren in Lösung gebracht und die Lösung unter Nachspülen quantitativ in ein Kölbchen von etwa 300 ccm Inhalt übertragen; dazu 20 ccm n/100 Jodlösung, wobei sich die Flüssigkeit gelblich färbt. Man fügt *sogleich* 70 ccm n/10 H_2SO_4 hinzu, wobei das freiwerdende Jod der Lösung eine rotgelbe Färbung erteilt. Nach Zusatz von Stärkekleister wird mit n/100 Thiosulfatlösung zurücktitriert, z. B.:

5 ccm Harn ⟶ vorgelegt 20 ccm n/100 Jod,
zurücktitriert 16,3 ccm n/100 Thiosulfat,
verbraucht 3,7 ccm n/100 Jod × 0,00048 = 0,00177 g Ur,
d. i. für 100 ccm Harn = 0,0354 g Harnsäure.

3. Kontrollversuche; Vergleich mit dem kolorimetrischen Verfahren von Cohen-Tervaert.

a) 5 ccm normalen Harnes ergaben:

kolorimetrisch nach *Cohen-Tervaert* . . .	0,0026 g Ur
jodometrisch	0,0031 g „
Mittel . . .	0,0029 g Ur

Zu je 5 ccm desselben Harnes wurden je 0,0050 g Ur, in 0,4 proz. Li_2CO_3 gelöst, hinzugefügt. Nunmehr ergab die jodometrische Bestimmung:

0,0072 g, 0,0073 g } Harnsäure, statt wie verlangt 0,0029 + 0,0050 = 0,0079 g.

b) 5 ccm eines Harnes: jodometrisch 0,0038 g Ur,
5 ccm desselben Harnes nach Zusatz von 0,0050 g Ur ergaben 0,0083 g Ur statt 0,0088 g.

c) 5 ccm eines Harnes:

kolorimetrisch nach *Cohen-Tervaert* . . .	0,0027 g Ur
jodometrisch	0,0029 g „
Mittel . . .	0,0028 g Ur

5 ccm desselben Harnes nach Zusatz von 0,0050 g Ur, gefunden 0,0084 g Ur statt 0,0028 + 0,0050 = 0,0078 g.

d) 5 ccm eines Harnes:

kolorimetrisch nach *Cohen-Tervaert* . . .	0,0020 g Ur
jodometrisch	0,0020 g „
Mittel . . .	0,0020 g Ur

5 ccm desselben Harnes nach Zusatz von 0,0050 g Ur; jodometrisch: 0,0065 g Ur statt 0,0020 + 0,0050 = 0,0070 g.

e) Einfluß eines *Zusatzes von Lithiumcarbonat* sowie der Einwirkung des *Ammoniumchloridzusatzes* in der *Wärme*.

5 ccm eines Harnes jodometrisch:

wie gewöhnlich	0,0024 g Ur
bei Zusatz von NH_4Cl in der Wärme bei 50°	0,0025 g „
bei Zusatz von 5 ccm Li_2CO_3 (0,4 proz.) .	0,0025 g „ 0,0026 g „

Die Varianten waren also ohne jeden Einfluß geblieben.

f) Harn eines Ekzemkranken:

nach *Cohen-Tervaert*, für 100 ccm Harn .	0,042 g Ur
jodometrisch, für 100 ccm Harn	0,044 g „

g) Normaler Harn:

nach *Cohen-Tervaert*, für 100 ccm Harn . .	0,0038 g Ur
	0,0034 g „
Mittel . . .	0,0036 g Ur
jodometrisch, für 100 ccm Harn	0,0038 g Ur
	0,0033 g „
Mittel . . .	0,0036 g Ur

h) Normaler Harn:

nach *Cohen-Tervaert*, für 100 ccm Harn .	0,0065 g Ur
jodometrisch, für 100 ccm Harn	0,0070 g „

i) Normaler Harn:

	0,050 g Ur
nach *Cohen-Tervaert*, für 100 ccm Harn . .	0,050 g „
	0,050 g „
Mittel . . .	0,050 g Ur
	0,060 g Ur
jodometrisch	0,055 g „
	0,055 g „
Mittel . . .	0,057 g Ur

4. Vergleich mit dem Verfahren von Hopkins-Wörner[1]).

Bei der *Wörner*schen Modifikation des Verfahrens von *Hopkins* wird bekanntlich die Harnsäure aus dem Harn mittels Chlorammoniums als Ammoniumurat vollständig ausgefällt, das Ammoniak des Niederschlages durch Erwärmen mit 1proz. Natronlauge vollständig entfernt und der N der so erhaltenen Natriumuratlösung nach *Kjeldahl* bestimmt.

a) Normaler Harn:

nach *Hopkins-Wörner*, für 100 ccm Harn .	0,050 g Ur
nach *Cohen-Tervaert*, für 100 ccm Harn . .	0,047 g „
	0,044 g „
Mittel . . .	0,045 g Ur
jodometrisch, für 100 ccm Harn	0,048 g Ur
	0,044 g „
Mittel . . .	0,046 g Ur

b) Harn nach Atophaneinnahme:

nach *Hopkins-Wörner*, für 100 ccm Harn .	0,077 g Ur
nach *Cohen-Tervaert*, für 100 ccm Harn . .	0,065 g „
	0,070 g „
Mittel . . .	0,068 g Ur
jodometrisch	0,080 g Ur
	0,080 g „
Mittel . . .	0,080 g Ur

[1]) *E. Wörner*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **29**, 70, 1899.

5. Vergleich mit dem Verfahren nach Folin-Schaffer[1]).

Dieses Verfahren beruht bekanntlich auf der Fällbarkeit der Harnsäure als harnsaures Ammon durch Ammonsulfat und der Titration der gefällten Harnsäure mit n/20 $KMnO_4$ in schwefelsaurer Lösung.

a) Harn:

nach *Folin-Schaffer*, für 100 ccm Harn . .	0,042 g Ur 0,043 g „
Mittel . . .	0,043 g Ur
jodometrisch	0,051 g Ur 0,048 g „ 0,044 g „
Mittel . . .	0,047 g Ur

b) Harn:

nach *Folin-Schaffer*, für 100 ccm Harn . .	0,078 g Ur
jodometrisch	0,080 g „ 0,078 g „ 0,079 g „
Mittel . . .	0,079 g Ur

c) Harn:

nach *Folin-Schaffer*, für 100 ccm Harn . .	0,028 g Ur 0,025 g „
Mittel . . .	0,026 g Ur
jodometrisch, für 100 ccm Harn	0,028 g Ur 0,025 g „
Mittel . . .	0,026 g Ur

6. Versuche mit Variation der Menge analysierten Harnes.

a) Mischharn, jodometrisch:

5 ccm analysiert, für 100 ccm	0,062 g Ur
10 ccm „ „ 100 ccm	0,054 g „
20 ccm „ „ 100 ccm	0,053 g „

b) Mischharn:

5 ccm analysiert, für 100 ccm	0,0556 g Ur 0,0595 g „
Mittel . . .	0,0576 g Ur
10 ccm analysiert, für 100 ccm	0,0518 g „
20 ccm „ „ 100 ccm	0,0559 g „

[1]) *O. Folin*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **24**, 224, 1898; *O. Folin* und *Ph. A. Schaffer*, ebendaselbst **32**, 552, 1901.

7. *Weitere Zusatzversuche.*

a) 5 ccm Harn:

jodometrisch	0,0021 g Ur [1])
	0,0019 g „ [1])
	0,0019 g „ [2])
Mittel . . .	0,0020 g Ur

Nach Zusatz von 0,0050 g Ur in Li_2CO_3-Lösung:

gefunden statt 0,0020 + 0,0050 = 0,0070 g Ur.
0,0066 g Ur.

b) 5 ccm Harn:

jodometrisch	0,0022 g Ur
	0,0022 g „
Mittel . . .	0,0022 g Ur

Harnsäure als 0,1 proz. Lösung in 0,4 proz. Li_2CO_3-Lösung zugesetzt

nach Zusatz von	0,0020 g Ur	statt	0,0042 g	gefunden	0,0043 g
„ „ „	0,0030 g „	„	0,0052 g	„	0,0056 g
„ „ „	0,0040 g „	„	0,0062 g	„	0,0058 g

Ein Überblick über die mitgeteilten Resultate lehrt, daß sich das Verfahren als praktisch brauchbar, bequem und wenig zeitraubend erwiesen hat. Die Ausführung einer Bestimmung nimmt, die zweistündige Wartezeit nach Zusatz des Ammoniumchlorids abgerechnet, kaum mehr als ½ Stunde wirkliche Arbeitszeit in Anspruch. Da das Verfahren nur wenig Harn (5 ccm) braucht und keine besondere Apparatur (außer einer Zentrifuge) erfordert und in seinen Leistungen wohl kaum hinter den für gewöhnlich angewandten Methoden zurücksteht, dürfte sich dasselbe für die praktische Anwendung für viele klinische und Laboratoriumszwecke nicht ungeeignet erweisen. Die Fehler dürften im allgemeinen bei richtiger Anwendung das Ausmaß von 0,005 g Ur pro 100 ccm Harn kaum überschreiten. Da sich ein bei Verarbeitung von 5 bis 10 ccm Harn gemachter Fehler naturgemäß bei Umrechnung auf die Tagesmenge Harn sehr stark multipliziert, wird dort, wo die größte erreichbare Genauigkeit gefordert wird, den mit großen Harnmengen arbeitenden, allerdings einen ganz unvergleichlich größeren Zeitaufwand erfordernden Methoden der Vorzug eingeräumt werden müssen.

Zusammenfassung.

Während das Studium des Jodbindungsvermögens des gesamten Harns („Jodzahl“) wegen der Vieldeutigkeit der durch eine große Anzahl von Harnbestandteilen bewirkten Jodbindung wenig aussichtsvoll erscheint, gelingt es einen der jodbindenden Hauptbestand-

---

[1]) Einmal durch Zentrifugieren mit Ammonsulfat gewaschen.
[2]) Zweimal durch Zentrifugieren mit Ammonsulfat gewaschen.

teile, die Harnsäure, sehr wohl auf jodometrischem Wege nach vorausgegangener Abtrennung derselben als Ammoniumurat mit Hilfe der Zentrifuge (nach dem Vorgange von *Cohen-Tervaert*) zu bestimmen. Die Titration ergibt ausreichend konstante Verhältnisse (Verbrauch von $3\frac{1}{2}$ Atomen Jod pro Molekül Harnsäure), wenn man das Jod unter bestimmten Bedingungen nach dem Vorgange von *J. Kreidl* in statu nascendi auf die Harnsäure einwirken läßt. Da das Verfahren nur eine geringe Harnmenge (5 ccm), wenig Zeit und keine besonderen Apparate (nicht einmal eine chemische Wage oder ein Kolorimeter) erfordert, dürfte dasselbe sich für viele Zwecke des Laboratoriums und der Klinik (wie der Vergleich desselben mit dem kolorimetrischen Verfahren der Harnsäurebestimmung mit Hilfe von Phosphorwolframsäure, sowie mit den Methoden von *Hopkins-Wörner* und von *Folin-Schaffer* lehrt) brauchbar erweisen.

Über die Substanzen, welche die Oberflächenspannung des Blutes bestimmen.

Von

Tyuzi Tominaga.

(Aus dem physiologischen Institut der Universität Groningen.)

(Eingegangen am 16. Juli 1923.)

Es ist schon seit längerer Zeit gut bekannt, daß das Blut oder das Blutserum eine viel niedrigere Oberflächenspannung hat als das Wasser und dazu, daß diese Spannung normal ganz konstant ist. Von welchen Bestandteilen des Serums sie hauptsächlich verursacht wird, ist dagegen bis jetzt noch nicht ganz klar festgestellt. Im allgemeinen kann man zwei Gruppen annehmen; eine Gruppe erniedrigt die Oberflächenspannung des Wassers, und die andere Gruppe hemmt diese Erniedrigung. Erste Gruppe: Fettsäuren, Phosphatide, Albumosen und Peptone; zweite Gruppe: Cholesterin und Eiweißstoff. Die Seifen werden normal im Blutserum inaktiviert, indem sie unlösliche Verbindungen mit Ca- oder Mg-Ion bilden[1]). Deshalb kann man nicht ohne weiteres voraussagen, daß die erniedrigte Oberflächenspannung des Serums von den Lipoiden verursacht wird, wenn eine Seifenlösung auch stark kapillaraktiv ist. Wie es schon von *J. Traube*[2]) angegeben wurde, erniedrigen nur kleiner molekulare Eiweißkörper, wie Albumosen oder Peptone, die Oberflächenspannung des Wassers ziemlich stark, dagegen beeinflussen größer molekulare Eiweißkörper, wie Globuline oder Albumine, sie sehr wenig. Es ist auch von mehreren Autoren angenommen und bestätigt worden, daß die Kapillaraktivität der Eiweißkörper mit der Ionisation zunimmt. Andererseits wird auch angegeben, daß die Kapillaraktivität verschiedener kapillaraktiver Substanzen sich durch Adsorption an die Eiweißkörper vermindert.

---

[1]) *R. Brinkman* en *A. von Szent-Gyoergyi*, Koninklijke Akademie van Wetenschappen te Amsterdam **32**, Nos. 1 en 2, S. 155, 1923.

[2]) *J. Traube* und *F. Blumenthal*, Arch. f. exp. Pathol. u. Therap. **22**, 117, 1906.

So haben die Eiweißkörper ihre größte Bedeutung nicht für die Erniedrigung der Oberflächenspannung des Serums, sondern für die Erhaltung ihrer Konstanz.

Die statische Oberflächenspannung einer Lösung wird von dem darin enthaltenen, am stärksten kapillaraktiven Stoff beherrscht, und diesen am stärksten kapillaraktiven Stoff im Plasma möchte ich der Einfachheit halber als „*die maximal kapillaraktive Substanz*“ bezeichnen. Im Gegensatz zu der dynamischen Oberflächenspannung ändert die statische Oberflächenspannung einer Flüssigkeit sich sehr wenig mit der Konzentration des gelösten kapillaraktiven Stoffes; besonders ist das sehr ausgesprochen, wenn die kapillaraktive Substanz von kolloidaler Natur ist, weil die kolloide Substanz sich nötigenfalls fast total an die Flüssigkeitsoberfläche adsorbieren läßt. Deshalb kann man auch annehmen, daß die statische Oberflächenspannung einer Flüssigkeit von dem darin enthaltenen maximal kapillaraktiven Stoffe verursacht wird, wenn auch die Konzentration dieser Substanz sehr klein ist. Zur Auffindung dieser Substanz habe ich verschiedene Eiweißkörper des normalen Serums mit bekannten Methoden fraktioniert gefällt und die statische Oberflächenspannung des Zentrifugats bzw. Filtrats gemessen, um zu wissen, in welcher Fraktion die maximal kapillaraktiven Substanzen, mit anderen Worten die die Oberflächenspannung des Serums verursachenden Substanzen enthalten sind.

Als Methode, die statische Oberflächenspannung zu messen, habe ich die Ringmethode nach *R. Brinkman-van Dam*[1]) angewandt, weil sie sehr einfach und für diesen Fall sehr geeignet ist, wie ich früher berichtet habe[2]).

I. Dialyseversuch des Serums.

Beim Dialyseversuch, welcher von mir mittels geprüfter *Abderhalden*scher Hülse angestellt wurde, konnte ich niemals Oberflächenspannungserniedrigung der Außenflüssigkeit auffinden, selbst nicht nach 20stündigem Stehen bei Zimmertemperatur. Um einer geringen Menge kapillaraktiver Substanz auf die Spur zu kommen, ist unsere Ringmethode besonders geeignet, da man noch eine deutliche Erniedrigung selbst in 10000fach verdünntem Serum aufdecken kann. Deshalb muß die kapillaraktive Substanz im Serum entweder von kolloidaler Natur oder in einer gebundenen Form vorhanden sein, wenn man vollständige Adsorption der Substanz an die Hülse selbst ausschließen darf.

---

[1]) *R. Brinkman* und Frl. *van Dam*, Münch. med. Wochenschr. 1921. Nr. 48, S. 1550.

[2]) *T. Tominaga*, diese Zeitschr. **140**, 230, 1923.

II. Einfluß der Fibrinausscheidung auf die Oberflächenspannung des Blutes.

Serum und Plasma desselben Blutes zeigen beinahe dieselbe Oberflächenspannung. Dies wurde schon von mehreren Beobachtern angegeben, und ich konnte auch denselben Befund mit Kaninchenblut nach unserer Ringmethode machen; die Fibrinausscheidung hat keinen merklichen Einfluß auf die Oberflächenspannung des Blutes. Man kann deshalb aussagen, daß das Fibrinogen kein maximal kapillaraktiver Stoff des Blutes sei.

III. Einfluß der Globulinpräzipitation auf die Oberflächenspannung des Serums.

Als Ausgangsmaterial habe ich frisches Serum des Kaninchens gebraucht, weil es ganz sauber und leicht zu bekommen ist. Zur Präzipitation des Globulins habe ich die Aussalzungsmethode mit Magnesiumsulfat oder Ammoniumsulfat angewandt.

a) Fällung mit Magnesiumsulfat.

Frisches Kaninchenserum wurde 10fach verdünnt mit destilliertem Wasser und nach *Hammarsten*[1]) die neutral korrigierte Flüssigkeit erwärmt auf 30°C mit fein gepulvertem, kristallinischem Magnesiumsulfat unter Rühren übersättigt. Dann blieb die Mischung eine Nacht bei Zimmertemperatur stehen, um das im Überschuß gelöste Salz auskristallisieren zu lassen. Am nächsten Morgen habe ich die Oberflächenspannung des klaren Filtrats mit unserer Ringmethode gemessen. Um die Zufügung kapillaraktiver Substanzen zu vermeiden, habe ich zur Neutralisation kapillarinaktive n-Schwefelsäurelösung anstatt kapillaraktiver Essigsäure gebraucht und als Indikator empfindliches Lackmuspapier angewandt. Da das Filtrierpapier ziemlich viel kapillaraktive Substanz an sich bindet, mußte ich möglichst Filtration vermeiden; aber bei dieser Operation wurde ich zur Filtration genötigt, weil die Fällung schwer abzuzentrifugieren war. Das Resultat ist in folgender Tabelle zusammengestellt:

Tabelle I.

		Relative Oberflächenspannung Zimmertemperatur 16,5—17°C				Bemerkungen
		direkt n. der Eingießung	nach 10 Min.	nach 60 Min.	der erfrischten Oberfläche	
Gesättigte Magnesiumsulfatlösung		1,102	1,103	1,106	1,116	Durchschnitt des statischen Wertes 1,104
Originalserum		0,791 0,785	0,785	0,779	0,831	Hämoglobin frei, leicht opalisierend
Mit destilliertem Wasser 10fach verdünnt. Serum		0,881 0,866	0,842	0,836	0,889	
Filtrat d. Magnesiumsulfatsättigung	I.	0,896	0,872	0,858	0,957	Ganz klar
	II.	0,866	0,866	0,855	0,962	
Auf gesättigte Magnesiumsulfatlösung umgerechnet	I.	0,812	0,790	0,777	0,867	
	II.	0,785	0,785	0,775	0,871	

[1]) *Hammarsten*, Zeitschr. f. physiol. Chem. 8, 467, 1894. Auch zitiert in Biochem. Arbeitsmeth. 2, 361.

Die Zahlen in der Tabelle zeigen relative Oberflächenspannung gegen Wasser [nicht korrigiert nach der von mir angegebenen Formel[1])]. In der letzten Zeile habe ich relative Oberflächenspannung des Filtrates gegen die Oberflächenspannung der gesättigten Magnesiumsulfatlösung angegeben, indem ich den statischen Wert der gesättigten Magnesiumsulfatlösung durchschnittlich als 1,104 betrachte.

Aus der Tabelle I kann man ersehen, daß die Oberflächenspannung des mit destilliertem Wasser zehnfach verdünnten Serums etwas höher ist als die des Serums selbst. Es ist sehr auffallend, daß die Oberflächenspannung des Filtrats der Globulin präzipitierten Flüssigkeit ebenso niedrig ist wie die des Serums selbst. Da die Oberflächenspannung im ersten Augenblick nach der Eingießung schon ziemlich niedrig und die Erniedrigung im weiteren Zeitablauf nicht groß ist, so muß man annehmen, daß die kapillaraktiven Substanzen in relativ reichlicher Menge enthalten sind oder schnell diffundieren. Nach *Hammarsten* wird das Globulin aus Serum durch diese Prozedur quantitativ niedergeschlagen; so kann man schließen, daß das Globulin kein maximal kapillaraktiver Stoff des Serums ist.

b) Fällung mit Ammonsulfat.

Frisches Kaninchenserum wurde mit destilliertem Wasser 5fach verdünnt, dann mit gleichem Teile gesättigter Ammonsulfatlösung vermischt und nach 1 Stunde abzentrifugiert. Vom klaren Zentrifugat habe ich die Oberflächenspannung gemessen:

Tabelle II.

	Relative Oberflächenspannung Zimmertemperatur 17,5° C				Bemerkungen
	direkt n. der Eingießung	nach 10 Min.	nach 60 Min.	der erfrischten Oberfläche	
Halb gesättigte Ammonsulfatlösung	1,087	1,090	1,087	1,090	Durchschnitt des statischen Wertes 1,087
Originalserum	0,791 0,785	0,785	0,779	0,831	Hämoglobin frei, etwas opalisierend
Zentrifugat I.	0,859	0,836	0,842	0,881	
Zentrifugat II.	0,858	0,830	0,830	0,878	Ganz klar
Gegen halbgesättigte Ammonsulfatlösung umgerechnet I.	0,790	0,769	0,775	0,981	
Gegen halbgesättigte Ammonsulfatlösung umgerechnet II.	0,789	0,764	0,764	0,808	

Wie man aus der Tabelle ersehen kann, ist die gesättigte Ammonsulfatlösung rein genug für diesen Versuch, weil die Oberflächenspannung keinen bedeutenden Unterschied zwischen statischem und dynamischem Wert zeigte. Das Zentrifugat zeigt noch eine stark erniedrigte Oberflächenspannung. Wenn man diese relative Oberflächenspannung gegen die der halbgesättigten Lösung umrechnet, so ist der Wert genau gleich der Oberflächenspannung des Serums.

[1]) Diese Zeitschr., l. c.

Aus den obigen zwei Versuchsreihen ist es klar, *daß die Globulinfällung keinen Einfluß auf die Oberflächenspannung des Serums ausübt, daß wenigstens das Globulin als ein maximal kapillaraktiver Stoff nicht betrachtet werden darf.*

III. Einfluß der totalen Enteiweißung auf die Oberflächenspannung des Serums.

Es ist eine schwierige Aufgabe, ja sogar fast unmöglich, alles Albumin aus Serum quantitativ zu entfernen, ohne die nahe verwandten Albumosen mitzureißen. *Abderhalden*[1]) schreibt, daß er Albumosen im Blutplasma niemals nachweisen konnte und sicher keine größere Menge im zirkulierenden Blute enthalten ist. So mußte ich mich damit begnügen, verschiedene Enteiweißungsmethoden durchzuprüfen und das Resultat untereinander zu vergleichen.

a) Enteiweißung mit Ammonsulfat.

1. Mit destilliertem Wasser 10fach verdünntes Kaninchenserum wurde mit n-Schwefelsäurelösung schwach sauer gegen Lackmuspapier (absichtlich habe ich Essigsäure vermieden, weil sie ziemlich stark kapillaraktiv ist) gemacht und mit fein gepulvertem Ammoniumsulfat bei Zimmertemperatur übersättigt. Von dem klaren Zentrifugat habe ich die Oberflächenspannung gemessen.

2. Nach *Devoto*[2]) wurden 10 ccm des 10fach verdünnten Kaninchenserums ohne Korrektion der Reaktion mit 9 g gepulvertem Ammonsulfat in der Wärme gesättigt, dann 30 Minuten lang in dem Dampfbade mit Wasserdampf erhitzt. Nach der Abkühlung wurde die Flüssigkeit abzentrifugiert und die Oberflächenspannung des klaren Zentrifugates gemessen. Das Resultat ist folgendes:

Tabelle III.

			Relative Oberflächenspannung Zimmertemperatur 16,5—17,5° C				Bemerkungen
			direkt n. der Eingießung	nach 20 Min.	nach 60 Min.	der erfrischten Oberfläche	
Gesättigte Ammonsulfatlösung			1,192	1,189	1,192	1,191	Durchschnitt des statischen Wertes 1,190
(1.) Ohne Erhitzung		I.	1,180	1,179	1,179	1,182	*Hellers* Probe und Sulfosalicylsäurereaktion negativ.
		II.	1,192	1,191	1,192	1,192	
	Gegen gesättigte Ammonlösung umgerechnet	I.	0,992	0,991	0,991	0,994	Phosphorwolframsäurereaktion kann man nicht anwenden
		II.	1,002	1,001	1,002	1,002	
(2.) Nach *Devoto* erhitzt		I.	1,163	1,163	1,103	1,180	
		II.	1,179	1,090	1,078	1,190 n. 15' 1,142	Sulfosalicylsäurereaktion negativ
	Gegen gesättigte Lösung umgerechnet	I.	0,978	0,978	0,927	0,989	
		II.	0,991	0,916	0,906	1,004 n. 15' 0,960	

[1]) *Abderhalden*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **42**, 156, 1904; **44**, 36, 1905; **51**, 287, 1907. — [2]) *Devoto*, zit. in Biochem. Arbeitsmeth. **1**, 686.

Aus der Tabelle kann man ersehen, daß die gesättigte Ammonsulfatlösung ganz rein ist und die Sättigung mit Ammonsulfat bei schwach saurer Reaktion alle kapillaraktiven Substanzen mit den Eiweißkörpern zusammen präzipitiert; dagegen zeigte das Zentrifugat der erhitzenden Methode nach *Devoto* geringe Erniedrigung der Oberflächenspannung, während es gegen Sulfosalicylsäure auch negativ reagierte. Nach *Devoto* kann man Pepton im Filtrat nachweisen. Es ist im allgemeinen anerkannt, daß das Ammoniumsulfat auch Albumose mitpräzipitiert. Ob diese geringe Erniedrigung der Oberflächenspannung durch die geringe Menge Pepton und andere niedrigere Eiweißabbauprodukte, oder durch gewisse Lipoide verursacht worden ist, welche aus dem adsorbierten Eiweißkörper bei der Hitzedenaturierung befreit wurden, kann ich nicht entscheiden. Jedenfalls ist es ein kolloidaler Vorgang, weil die Spannung der erfrischten Oberfläche ganz so hoch wie die der gesättigten Ammonsulfatlösung war und sich mit der Zeit wieder erniedrigte. Da die Erniedrigung ganz gering ist, so können wir damit maximale Erniedrigung des Blutserums nicht erklären.

b) Enteiweißung mit Salzsäure und Quecksilberchlorid.

Zum zweifach verdünnten Kaninchenserum wurden die doppelte Menge 2,5proz. Salzsäure und die doppelte Menge 5proz. Sublimatlösung zugesetzt und vermischt. Von dem nach 3 bis 4 Stunden zentrifugierten klaren Zentrifugat habe ich direkt die Oberflächenspannung gemessen, indem ich die angegebene Durchleitung von Schwefelwasserstoff aussetzte:

Tabelle IV.

	Relative Oberflächenspannung Zimmertemperatur 17,5—18° C				Bemerkungen
	direkt n. der Eingießung	nach 10 Min.	nach 60 Min.	der erfrischten Oberfläche	
2,5 proz. Salzsäure . . .	1,01	1,01	0,980	—	Mit Kohle gereinigt
5 proz. Sublimatlösung .	1,015	1,015	1,014	1,013	Gesättigt
I.	0,877 0,863	0,835	0,805	1,016 n. 10' 0,853	Sulfosalicylsäure- und Phosphorwolframsäurereaktion negativ
II.	1,014 0,983	0,918	0,871	1,011 n. 10' 0,921	Dasselbe
III.	0,929 0,893	0,817	0,801	1,007 n. 10' 0,892	Dasselbe

Aus der Tabelle ersieht man, daß das Zentrifugat eine ebenso niedrige Oberflächenspannung zeigt wie die Oberflächenspannung des

zehnfach verdünnten Serums, während Sulfosalicylsäure und Phosphorwolframsäure darin keine Trübung hervorgerufen haben. Da der Anfangswert ziemlich hoch ist und sich im weiteren Zeitablauf immer mehr erniedrigt, so könnte es als kolloidaler Stoff von geringer Menge betrachtet werden.

c) Enteiweißung mit Phosphorwolframsäure.

5 g Phosphorwolframsäure wurden in 100 ccm 2,5 proz. Salzsäure bzw. 5 proz. Schwefelsäure gelöst. Verschiedene Mengen dieser Reagenzien habe ich mit 10 ccm eines 10 fach verdünnten Serums vermischt. Nach 2 Stunden wurde das Präzipitat abzentrifugiert und die Oberflächenspannung des klaren Zentrifugates gemessen:

Tabelle V.

		Relative Oberflächenspannung Zimmertemperatur 17,5° C				Bemerkungen
		direkt n. der Eingießung	nach 10 Min.	nach 60 Min.	der erfrischten Oberfläche	
H Cl-Phosphorwolframsäure	10 fach verdünnte H Cl-Phosphorwolframsäure	0,999	1,001	1,00	1,002	
	10 ccm des 10 fach verdünnten Serums + 1 ccm Phosphorwolframsäure	0,841 0,834	0,821	0,826	0,868	Das Zentrifugat leicht opalisierend. Sulfosalicylsäurereaktion schwach positiv
	Dasselbe + 1,5 ccm Phosphorwolframsäure	0,997 0,999	0,997	1,003	0,996	Das Zentrifugat klar. Sulfosalicyl- und Phosphorwolframsäurereaktion negativ
	Dasselbe + 2,0 ccm Phosphorwolframsäure	0,974	0,961	0,952	1,002	Dasselbe
	Dasselbe + 3,0 ccm Phosphorwolframsäure	1,003	0,962	0,949	0,990	Dasselbe
H_2SO_4-Phosphorwolframs.	10 fach verdünnte H_2SO_4-Phosphorwolframsäure	0,998	1,003	1,00	1,003	
	10 ccm des 10 fach verdünnten Serums + 1,0 ccm Reagens	0,997 1,00	0,980	0,899	0,998	Das Zentrifugat leicht opalisierend. Sulfosalicylsäurereaktion negativ. Phosphorwolframsäurereaktion Spur positiv
	Dasselbe + 1,5 ccm Reagens	1,002	1,00	0,994	0,998	Das Zentrifugat klar. Die beiden Reaktionen negativ
	Dasselbe + 2,0 ccm Reagens	1,003	1,007	1,005	0,999	Dasselbe
	Dasselbe + 3,0 ccm Reagens	0,984	0,982	0,982	—	Dasselbe

Aus der Tabelle V kann man ersehen, daß die kapillaraktiven Substanzen des Serums durch Phosphorwolframsäure vollständig weg-

genommen wurden. Wenn das Zentrifugat gegen Sulfosalicylsäure noch positiv reagiert, so ist die Oberflächenspannung ziemlich niedrig, wie die des zehnfach verdünnten Serums. Mit dem Verschwinden der Phosphorwolframsäurereaktion zeigt die Oberflächenspannung bedeutende Erhöhung bis zum Wasserwert. Aber beim weiteren Zusatz der Reagenzien wurde die Oberflächenspannung wieder ein wenig erniedrigt; das kann von der geringen Verunreinigung der Reagenzien herrühren, doch muß man dabei sich erinnern, daß das Phosphorwolframsäurepräzipitat sich in überschüssigem Präzipitat teilweise wieder lösen kann[1]).

d) Enteiweißung mit Pikrinsäure.

Man fügt dem Serum 10fache Mengen gesättigter Pikrinsäurelösung zu und zentrifugiert nach 1 bis 2 Stunden. Das Resultat war folgendes:

Tabelle VI.

	Relative Oberflächenspannung Zimmertemperatur 17—17,5° C				Bemerkungen
	direkt n. der Eingießung	nach 10 Min.	nach 60 Min.	der erfrischten Oberfläche	
Gesättigte Pikrinsäurelösung	1,015	0,987	0,949	1,015	
Serum 1 ccm + Pikrinsäurelösung 9 ccm	0,974 0,967	0,925	0,887	0,956	Sulfosalicylsäurereaktion negativ
Dasselbe	1,015	0,938	0,886	0,956	Dasselbe
Serum 1 ccm + Pikrinsäurelösung 5 ccm	0,907 0,894	0,856	0,807	—	Dasselbe
Serum 1 ccm + Pikrinsäurelösung 14 ccm	1,015 0,999	0,953	0,939	—	Dasselbe

Aus der Tabelle VI kann man ersehen, daß die Oberflächenspannung des Zentrifugats in allen Fällen ein wenig niedrig ist, während alle Zentrifugate gegen Sulfosalicylsäure ganz negativ reagierten; die Phosphorwolframsäureprobe kann man in diesem Falle nicht anwenden, weil das Reagens einen starken Niederschlag mit Pikrinsäure gibt. Diese Pikrinsäurelösung selbst war auch etwas kapillaraktiv, und ich habe zweimal fraktioniert umkristallisiert, trotzdem konnte ich es nicht weiter reinigen. Aber mit der Zunahme der Pikrinsäurelösung vermindert die Erniedrigung sich umgekehrt proportionell und erreicht endlich die Oberflächenspannung der Pikrinsäurelösung selbst. Deshalb kann man annehmen, daß ein Teil der Erniedrigung von den nicht

[1]) *Rona* und *Strausz*, Biol. Arbeitsmeth., Abtlg. I, Teil 8, S. 715.

präzipitierten Serumkolloiden herrührt, und die genügende Menge Pikrinsäure (1 ccm Serum, 14 ccm gesättigte Pikrinsäurelösung) kapillaraktive Substanzen des Serums auch fast vollständig präzipitiert.

e) Enteiweißung mit Meta-Phosphorsäure.

10fach verdünntes frisches Kaninchenserum wurde mit verschiedenen Mengen 25proz. frisch bereiteter Meta-Phosphorsäurelösung gemischt und die Oberflächenspannung des klaren Zentrifugates gemessen. Das Resultat ist folgendes:

Tabelle VII.

	Relative Oberflächenspannung Zimmertemperatur 14—14,5° C				Bemerkungen
	direkt n. der Eingießung	nach 10 Min.	nach 60 Min.	der erfrischten Oberfläche	
25 proz. Meta-Phosphorsäurelösung	1,054	0,964	0,931	1,055	Phosphorwolframsäurereaktion gibt keine Trübung
10 fach verdünnte Meta-Phosphorsäurelösung	1,00	0,992	1,001	1,003	Dasselbe
10 fach verdünntes Serum 9,5 ccm + Meta-Phosphorsäurelösung 0,5 ccm	0,826 0,822	0,784	0,786	0,875	Sulfosalicylsäurereaktion negativ. Phosphorwolframsäurereaktion schwach positiv
10 fach verdünntes Serum 9,0 ccm + Meta-Phosphorsäurelösung 1,0 ccm	0,841 0,794	0,782	0,779	0,951	Dasselbe
Dasselbe	0,865 0,842	0,820	0,791	0,951	Dasselbe
10 fach verdünntes Serum 8,5 ccm + Meta-Phosphorsäurelösung 1,5 ccm	0,826 0,822	0,784	0,786	0,875	Dasselbe

Aus der obigen Tabelle ersieht man folgendes: Die gebrauchte 25proz., frisch bereitete Meta-Phosphorsäurelösung (*Mercks* Präparat) enthält eine Spur kapillaraktiver Substanz, aber kann praktisch fast rein betrachtet werden, weil sie bei zehnfacher Verdünnung (2,5proz. Lösung) keine merkbare Erniedrigung der Oberflächenspannung zeigt. Alle Zentrifugate zeigen ziemlich starke Erniedrigung der Oberflächenspannung, ganz so wie die des Serums, und die Phosphorwolframsäurereaktion tritt schwach positiv auf, während sie gegen Sulfosalicylsäure negativ reagierten. Als gewöhnliche Enteiweißungsmethode wendet man 1,0 ccm 25proz. Meta-Phosphorsäurelösung gegen 10 ccm Flüssigkeit an[1]). Wenn man mehr Meta-Phosphorsäure (1,5 : 8,5 ccm) zusetzt, bleiben die Verhältnisse doch ganz gleich. Diese kapillaraktive

[1]) *O. Folin* and *W. Denis*, Journ. biol. Chem. **26**, 491, 1916; **39**, 259, 1919.

Substanz scheint in relativ reichlicher Menge enthalten zu sein, weil der Anfangswert schon ziemlich niedrig ist und auch die Oberflächenspannung der erfrischten Oberfläche sich nicht bedeutend erhöht.

f) Enteiweißung mit Kaolin.

Kaninchenserum wurde 20fach verdünnt mit destilliertem Wasser, dann mit N-Schwefelsäurelösung so weit schwach sauer gemacht[1]), bis die anfänglich entstehende Trübung sich wieder aufzuhellen beginnt. Zu 10 ccm der sauren Flüssigkeit wurden 2,0 bzw. 2,5 g Kaolin in kleinen Portionen unter stetem, tüchtigem Umschütteln hinzugefügt und bald abzentrifugiert. Das Resultat ist folgendes:

Tabelle VIII.

	Relative Oberflächenspannung Zimmertemperatur 16—16,5° C				Bemerkungen
	direkt n. der Eingießung	nach 10 Min.	nach 60 Min.	der erfrischten Oberfläche	
10 ccm destilliert. Wassers + 3 Tropfen n-H_2SO_4-Lösung + 2,5 g Kaolin	0,980	0,980	0,976	0,983	Abzentrifugiert
20fach verd. Serum — Nicht korrigiert	0,899 0,861	0,870	0,840	0,912	
20fach verd. Serum — Sauer korrigiert	0,761 0,747	0,743	0,740	0,796	40 ccm Flüssigkeit 10 Tr. Säurelösung, stark getrübt; mit weiteren 3 Tropfen ist die Trübung verschwunden
10 ccm verdünnten sauren Serums + 2,5 g Kaolin	0,988	0,985	0,978	0,992	Sulfosalicyl- und Phosphorwolframsäurereaktion negativ
Dasselbe	0,988	0,986	0,981	0,987	Dasselbe
10 ccm verdünnten sauren Serums + 2,0 g Kaolin	0,990	0,991	0,989	0,995	Dasselbe

Der Blindversuch mit Normal-Schwefelsäurelösung und Kaolin zeigt Spuren kapillaraktiver Substanz an, deren Ursache ich augenblicklich nicht auffinden kann. Wenn man aber den Kaolinversuch mit diesem Blindversuch vergleicht, so muß man schließen, daß fast alle kapillaraktiven Serumsubstanzen mit Kaolin weggegangen sind; damit reagierte die Phosphorwolframsäure auch ganz negativ.

g) Enteiweißung mit kolloidalem Eisenoxyd.

Von dem *Merck*-Präparat „Ferr. oxyd. dialys. in Lamellen" habe ich 5proz. Lösung hergestellt und verschiedene Mengen dieser Lösung zu 10 ccm vom 10fach verdünnten Serum zugesetzt und dasselbe durch den Zusatz von 5 Tropfen gesättigter Magnesiumsulfatlösung koagulieren lassen. Von dem klaren Zentrifugat wurde die Oberflächenspannung gemessen:

[1]) Biochem. Arbeitsmeth. 1, 686.

Tabelle IX.

	Relative Oberflächenspannung Zimmertemperatur 20—21° C				Bemerkungen
	direkt n. der Eingießung	nach 5 Min.	nach 15 Min.	nach 30 Min.	
10 fach verdünntes Serum	0,862	0,838	0,828	0,828	
10 ccm verdünnt. Serums + 2,0 ccm kolloidalen Eisenoxyds	0,948	0,914	0,916	0,914	Sulfosalicylsäurereaktion negativ, Phosphorwolframsäurereaktion Spur positiv
10 ccm verdünnt. Serums + 3,0 ccm Eisenoxyd	0,997	0,979	0,978	0,978	Die beiden Reaktionen negativ
10 ccm verdünnt. Serums + 4,0 ccm Eisenoxyd	0,999	1,000	1,003	1,00	Dasselbe

Aus der Tabelle IX ersieht man, daß die Oberflächenspannung sich mit der Zunahme der zugesetzten Kolloidaleisenoxydlösung erhöht, indem zuerst die Sulfosalicylsäurereaktion, dann die Phosphorwolframsäurereaktion negativ ausfällt; beim weiteren Zusatz der Kolloidaleisenlösung zeigte die Oberflächenspannung genau den Wasserwert. In anderen Fällen habe ich mehrmals gesehen, daß die Oberflächenspannung des Zentrifugats eine ganz gleiche Erniedrigung zeigt wie das Serum, wenn die Flüssigkeit durch die mangelhafte Wirkung der Kolloidaleisenlösung noch deutliche Sulfosalicylsäurereaktion oder positive *Heller*sche Probe zeigte. Da kolloidales Eisenoxyd selbst weder Erhöhung noch Erniedrigung der Oberflächenspannung des Wassers verursacht und die zugesetzte Salzlösung auch eine ganz geringe Menge ist, so kann man aus diesem Wasserwert des Zentrifugats sicher schließen, daß die kapillaraktive Substanz durch passende Menge der Kolloidaleisenlösung ganz vollständig gefällt wird.

Ergebnisse der Untersuchung.

1. Die maximal kapillaraktiven Substanzen des Serums sind kolloidaler Natur, weil sie durch die *Abderhalden*sche Hülse nicht dialysieren.

2. Wenn man die Globuline aus dem Serum mittels der Aussalzungsmethode niederschlägt, verändert die statische Oberflächenspannung der Flüssigkeit sich doch nicht merklich.

3. Wenn das Serum durch verschiedene Methoden enteiweißt wird, so verhalten die Oberflächenspannungen der Zentrifugate sich sehr verschieden: Sättigungsmethode mit Ammonsulfat, die Methode mit Phosphorwolframsäure, Pikrinsäure, kolloidalem Eisenoxyd und Kaolin präzipitieren alle kapillaraktiven Substanzen fast vollständig; dann folgt die Sublimatmethode; endlich kann man das Serum mit Meta-Phosphorsäure niemals von kapillaraktiven Substanzen befreien,

ja sogar zeigt die Oberflächenspannung dieses Zentrifugats fast die gleiche Erniedrigung wie die des Serums selbst.

4. Wenn man diese Kapillaraktivität des Zentrifugats mit seinem Verhalten gegen verschiedene Fällungsreaktionen der Eiweißkörper (*Heller*sche Probe, Sulfosalicylsäure und Phosphorwolframsäure) vergleicht, so bemerkt man deutlich, daß die Kapillaraktivität ganz parallel mit positivem Grade der Reaktion läuft. Falls die Sulfosalicylsäurereaktion deutlich positiv auftritt, ist die Oberflächenspannung fast gleich der des Serums; falls die Sulfosalicylsäurereaktion negativ, aber die Phosphorwolframsäurereaktion noch schwach positiv auftritt, ist die Oberflächenspannung der Flüssigkeit noch ziemlich erniedrigt. Erst nach dem Verschwinden der Phosphorwolframsäurereaktion erhöht die Oberflächenspannung sich bedeutend. Deshalb scheint es mir sehr interessant zu sein, nach den Angaben von *Graves* und *Kober*[1]) mit 3proz. Sulfosalicylsäurelösung zu enteiweißen, weil die kapillaraktiven Substanzen des Serums durch Sulfosalicylsäure nicht vollständig gefällt zu werden scheinen. Leider war die Sulfosalicylsäurelösung immer ziemlich stark kapillaraktiv, so daß ich sie bei dieser Untersuchung nicht verwenden konnte. *Van Creveld*[2]) gibt an, daß das Kammerwasser seine Oberflächenspannung nach der Enteiweißung mit Sulfosalicylsäurelösung nicht merklich erhöht. *Alma Hiller* und *D. d. van Slyke*[3]) haben verschiedene Enteiweißungsmethoden des Blutes darauf untersucht, wie sie sich gegen intermediäre Spaltungsprodukte der Eiweißkörper und Aminosäuren verhalten. Sie fanden: Phosphorwolframsäure und Pikrinsäure ließen mit Eiweißkörpern auch ihre intermediären Spaltungsprodukte wie Albumosen und Peptone aus einer *Witte*-Peptonlösung fast vollständig fällen, ohne Aminosäuren mitzureißen; Trichloressigsäure bei einer unterhalb 5proz. Konzentration präzipitierten dagegen diese intermediären Spaltungsprodukte, auch Aminosäuren, gar nicht; kolloidales Eisenoxyd, Quecksilberchlorid und Meta-Phosphorsäure standen zwischen Phosphorwolframsäure und Trichloressigsäure in bezug auf Fällung der intermediären Spaltungsprodukte. Wenn man ihre Resultate mit meiner Untersuchung vergleicht, findet man mehrere übereinstimmende Punkte in den beiden Untersuchungen. Leider konnte ich nicht mit Trichloressigsäure arbeiten, weil sie selbst ziemlich stark kapillaraktiv ist. Doch ist es sehr auffallend, *daß die Oberflächenspannung des Zentrifugats bei der Fällung der Albumosen und Peptone durch Ammonsulfat oder Phosphorwolframsäure fast Wasserwert zeigt*, *während sie bei der*

---

[1]) *Graves* and *Kober*, Journ. Amer. chem. Soc. **37**, 2430, 1915; auch zit. von *Rona* in Biol. Arbeitsmeth., Abtlg. I, Teil 8, H. 4, S. 721.

[2]) *Van Creveld*, erscheint in Arch. Niedl. de Physiol.

[3]) *Alma Hiller* and *D. d. van Slyke*, Journ. of biol. Chem. **58**, 253, 1922.

Anwesenheit der Albumosen und Peptone nach der Enteiweißung durch Meta-Phosphorsäure ganz gleich der des Serums bleibt. Wenn die Lipoide in dem am Eiweißkörper adsorbierten Zustande existieren, müssen sie bei der Enteiweißung durch Meta-Phosphorsäure auch zusammen gefällt werden.

5. Aus diesem Grunde kann man sagen, daß *die erniedrigte Oberflächenspannung des normalen Serums bzw. des Blutplasmas nicht von Globulinen oder Albuminen, sondern von Albumosen und Peptonen verursacht wird,* mit anderen Worten die maximal kapillaraktiven Substanzen des Blutes Albumosen und Peptone sind.

Zum Schluß nehme ich die Gelegenheit wahr, Herrn Prof. *Hamburger* und Herrn Dr. *R. Brinkman* für die freundlichen Ratschläge bestens zu danken.

Über die Bildung von Acetaldehyd bei der Vergärung von Fructose, Galaktose, Saccharose, Maltose und Lactose durch Bacterium coli und Bacillus lactis aerogenes.

Von

K. Nagai.

(Aus dem Kaiser Wilhelm-Institut für experimentelle Therapie und Biochemie in Berlin-Dahlem.)

(Eingegangen am 11. Juli 1923.)

Die neueren Untersuchungen über den Abbau der Kohlenhydrate haben ergeben, daß als Umsetzungsprodukt vielfach der Acetaldehyd auftritt und unter geeigneten Bedingungen in größerer Menge abgefangen werden kann. Für Hefen und Pilze liegt ein beträchtliches Material über diesen Gegenstand vor, während die entsprechenden Verhältnisse bei den bakteriellen Prozessen weniger genau bekannt sind. Für die Erreger der Essiggärung[1]), für die der Buttersäurebildung[2]) und der Cellulosezersetzung[3]) haben *Neuberg* und Mitarbeiter die Fähigkeit dargetan, Acetaldehyd zu bilden. Am Traubenzucker und zugehörigen Alkohol, dem Mannit, haben *Neuberg*, *Nord* und *Wolff*[4]) gezeigt, daß diese beiden Substanzen der Kohlenhydratreihe, gleich dem nahe verwandten Glycerin, durch Bacterium coli und den Bacillus lactis aerogenes unter Bildung reichlicher Mengen Acetaldehyd abgebaut werden.

Bei der großen Bedeutung, die verschiedenen anderen Zuckern im Haushalt der Natur zukommt, schien es nun von Wichtigkeit, auch diese Kohlenhydrate auf das Vermögen zu prüfen, unter der Einwirkung von Bakterien Acetaldehyd zu liefern. Gewählt wurden *Fruchtzucker*, *Rohrzucker*, *Galaktose*, *Milchzucker* und *Maltose*. Setzt man die

---

1) *Neuberg* und *Nord*, diese Zeitschr. **96**, 158, 1919.
2) *Neuberg* und *Arinstein*, ebendaselbst **117**, 269, 1921.
3) *Neuberg* und *Cohn*, ebendaselbst **139**, 527, 1923.
4) *Neuberg*, *Nord* und *Wolff*, ebendaselbst **96**, 133, 1919; **112**, 144, 1920.

genannten Zuckerarten dem Angriff des Bacterium coli und des B. lactis aerogenes aus unter den Bedingungen des Abfangverfahrens von *Neuberg* und *Reinfurth*[1]), das sich als Abfangmittel schwefligsaurer Salze bedient, so erhält man in allen Fällen[2]) Acetaldehyd in Mengen, die quantitativ bestimmt werden können und zum Teil recht ansehnlich sind.

Später bin ich dazu übergegangen, den zeitlichen Verlauf der Acetaldehydbildung zu verfolgen; um die Zahl der Einzelversuche nicht allzu sehr anschwellen zu lassen, habe ich mich darauf beschränkt, die Verhältnisse bei der Fructose und der Lactose genauer zu prüfen. Dabei wurde nur der Abbau unter dem Einfluß von B. coli studiert.

Über die Ergebnisse geben die im folgenden angeführten Versuche Auskunft.

Zu diesen Versuchen ist folgendes grundsätzlich zu bemerken. Es wurden stets die Zuckerarten in völliger Reinheit verwendet; als Nährlösung diente mit wenig Pepton versetztes Hefewasser, das in der gewohnten Weise bereitet und sterilisiert worden war. Zumeist wurde mit Dinatriumsulfit als Abfangmittel gearbeitet, gelegentlich auch mit Calciumsulfit. Wegen der sich bildenden Säuren ist ein Zusatz von steriler Kreide notwendig. Der entstandene Acetaldehyd wurde nach dem Destillations-Titrationsverfahren von *Neuberg* und *Reinfurth* (l. c.) ermittelt.

1. 50 ccm Hefewasser, 0,5 g Pepton und 5 g *Galaktose*. Dreimalige ½stündige Sterilisation im strömenden Dampf; darauf Zugabe von 7,5 ccm für sich sterilisierter 25proz. Lösung von Dinatriumsulfit (wasserfreiem Salz) sowie von 6 g bei 160° entkeimten Calciumcarbonats. Alsdann Impfung mit drei Ösen B. coli M.[3]). Am nächsten Tage war die Probe auf Acetaldehyd mit Nitroprussidnatrium und Piperidin nur schwach. Es erfolgte daher Nachimpfung mit abermals drei Ösen der Kultur. Nach 4 Tagen wurden im Gesamtgärgut 97 mg Acetaldehyd festgestellt.

2. 50 ccm Hefewasser, 0,5 g Pepton, 5 g *Galaktose*, 7,5 ccm 25proz. Dinatriumsulfit, 6 g kohlensauren Kalk. Vorbereitung und Behandlung wie zuvor. Impfung mit drei Ösen von B. lactis aerogenes[4]). Am nächsten Tage Acetaldehyd schwach vorhanden. Nachimpfung mit drei weiteren Ösen des Erregers. Nach 4 Tagen 120 mg Aldehyd.

---

[1]) *Neuberg* und *Reinfurth*, diese Zeitschr. **89**, 365, 1918.

[2]) Unter meinen Versuchsbedingungen habe ich in den Ansätzen mit Milchzucker (und Galaktose) das von *Emmerling* (Ber. **33**, 2477, 1900) beobachtete Galaktan nicht angetroffen.

[3]) Stamm von *M. Ficker*, dem bestens gedankt sei.

[4]) Stamm von *M. Ficker*.

3. und 4. Kontrolle zu 1. und 2. ohne Sulfitzugabe. Acetaldehyd war nicht nachweisbar.

5. 100 ccm Hefewasser, 1 g Pepton, 5 g *Galaktose,* 15 g steriles Calciumsulfit sowie 6 g keimfreie Kreide, B. lactis aerogenes. Am nächsten Tage Aldehyd qualitativ erkennbar. Nach 4 Tagen im Gesamtgärgut 28 mg Aldehyd. Wie ersichtlich, wirkt das Natriumsulfit im Vergleich zu $CaSO_3$ als kräftigeres Abfangmittel.

6. 100 ccm Hefewasser, 1 g Pepton, 10 g *Maltose,* 15 ccm 25proz. Dinatriumsulfitlösung, 12 g $CaCO_3$. Beimpfung mit drei Ösen B. coli. Die Gärung blieb 3 Tage lang schwach. Am vierten Tage war die Aldehydprobe deutlich. Nach einer weiteren Woche wurden 456 mg Acetaldehyd im Gesamtgärgut gefunden (es war noch reichlich unverbrauchter Zucker zugegen).

7. 100 ccm Hefewasser, 1 g Pepton, 10 g *Maltose,* 15 ccm 25proz. Na_2SO_3, Beimpfung mit drei Ösen B. lactis aerogenes. Erst am fünften Tage deutliche Aldehydprobe, nachdem am dritten Tage Nachimpfung erfolgt war; dann nach 48 Stunden 294 mg Acetaldehyd in der Gesamtmenge, die noch starke Zuckerproben gab.

8. 100 ccm Hefewasser, 1 g Pepton, 10 g *Galaktose,* 15 ccm 25proz. Dinatriumsulfit, 12 g $CaCO_3$. Impfung mit B. lactis aerogenes und nach 3 Tagen Nachimpfung; nach 2 Tagen nunmehr kräftige Aldehydreaktion. Nach 48 Stunden sodann 314 mg Acetaldehyd insgesamt. (Zucker noch reichlich zugegen.)

9. Gleicher Ansatz. Beimpfung mit B. coli. Nach 4 Tagen Acetaldehyd kräftig nachweisbar. Darauf noch einwöchige Aufbewahrung im Brutschrank. Auch nach dieser Zeit war der Zucker nicht verbraucht. Gefunden wurden im Gesamtgärgut 506 mg Acetaldehyd.

10. 100 ccm Hefewasser, 1 g Pepton, 10 g *Saccharose,* 15 ccm 25proz. Na_2SO_3, 12 g $CaCO_3$; Beimpfung mit drei Ösen B. coli. Die Gärung kam nur sehr langsam in Gang. Nach einer Woche im Gesamtgärgut 276 mg Acetaldehyd vorhanden.

11. Ansatz mit *Rohrzucker* wie vorher. Beimpfung mit B. lactis aerogenes. Am neunten Tage gefunden 243 mg Acetaldehyd.

12. 100 ccm Hefewasser, 1 g Pepton, 10 g reinster *Fruchtzucker,* 15 ccm 25proz. Dinatriumsulfit, 12 g Kreide. Beimpfung mit drei Ösen B. coli. Nach 3 Tagen Nachimpfung. Nach weiteren 3 Tagen schritt ich zur Aufarbeitung, obwohl noch reichlich Zucker vorhanden war. Ermittelt wurden 547 mg Acetaldehyd.

13. Versuch genau gleich dem vorigen, jedoch mit B. lactis aerogenes. Aldehydausbeute 323 mg.

14. 100 ccm Hefewasser, 1 g Pepton, 10 g *Milchzucker,* 15 ccm 25proz. Na_2SO_3, 12 g Kreide; drei Ösen B. coli. Am fünften Tage

starke Aldehydreaktion und Aufarbeitung trotz beträchtlichen Gehaltes an Zucker. Erhalten 527 mg Acetaldehyd.

15. 100 ccm Hefewasser, 1 g Pepton, 10 g *Milchzucker*, 15 ccm 25proz. Na_2SO_3, 12 g $CaCO_3$. Mit drei Ösen B. lactis aerogenes setzte die Gärung nur schwach ein. Deshalb Nachimpfung nach 3 Tagen. Nunmehr nach 48 Stunden Acetaldehyd sehr deutlich. Nach weiteren 2 Tagen ohne Rücksicht auf noch vorhandenen Zucker Aldehydbestimmung, die 248 mg Acetaldehyd anzeigte.

Die bisher mitgeteilten Versuche lehren, daß sämtliche untersuchte Mono- und Disaccharide befähigt sind, beim Abbau durch B. coli und das B. lactis aerogenes Acetaldehyd zu liefern. Die erzielten Ausbeuten schwanken zwischen 0,56 und 5,47 Proz. Dabei ist zu berücksichtigen, daß keineswegs aller Zucker umgesetzt worden war. Nach früheren Erfahrungen[1]) war mit der Möglichkeit zu rechnen, daß gebildeter Acetaldehyd wieder verschwindet. Die im Gärgut vorhandene Doppelverbindung zwischen Acetaldehyd und schwefligsaurem Salz ist ja nicht vollkommen beständig; durch Dissoziation wird Acetaldehyd frei. Der als Bodenkörper vorhandene kohlensaure Kalk sowie das sich bildende kohlensaure Natrium beeinflussen den Zerfall, der bei Brutschranktemperatur (in allen Fällen 37°) bereits merklich ist. Wie *Mazé*, *Perrier*, *Harden*, *Norris*, *Ehrlich* und *Haehn* gezeigt[2]) haben, vermag der Acetaldehyd den verschiedenen Mikroorganismen als alleinige Kohlenstoffquelle zum Aufbau ihrer Leibessubstanz zu dienen. Dementsprechend kann der Acetaldehyd sowohl durch chemische als durch physiologische Vorgänge eine Umformung erfahren.

Um festzustellen, ob eine Abnahme an Acetaldehyd bei meiner Versuchsanordnung tatsächlich während der Dauer der Experimente stattfindet, habe ich Serienversuche mit Fructose und Lactose vorgenommen, deren Ergebnis aus der nachstehend mitgeteilten Tabelle zu ersehen ist.

Die Ansätze wurden folgendermaßen gemacht.

a) 400 ccm Hefewasser, 40 g Fructose, 4 g Pepton, 60 ccm 25proz. Dinatriumsulfit, 48 g Calciumcarbonat (Sterilisation wie vorher angegeben). Beimpfung mit 12 Ösen B. coli. Die erste Bestimmung wurde nach 24 Stunden und dann fortlaufend jeweils eine solche nach der in der Tabelle angegebenen Zeit ausgeführt.

b) Ein genau gleicher Reihenversuch wurde mit *Lactose* unternommen. Die Mengenverhältnisse waren im Ansatz mit Milchzucker die gleichen wie mit Fruchtzucker.

[1]) *Neuberg* und *Nord*, diese Zeitschr. 96, 166, 1919; *Neuberg* und *Arinstein*, ebendaselbst 117, 273 und 293, 1921; *Neuberg* und *Cohen*, ebendaselbst 122, 212, 1921; *Neuberg* und *Cohn*, ebendaselbst 139, 532, 1923.

[2]) Zitiert nach *Neuberg* und *Nord*, l. c., S. 145.

Nach Tagen	In 50,0 ccm Gärgut waren vorhanden mg Acetaldehyd	
	a) beim Fructoseansatz	b) beim Lactoseansatz
1	21	29
2	51	66
3	65	111
4	112	178
6	184	205
8	287	218
15	197	247
36	144	148

Anstieg und Abfall der Acetaldehyderträge sind unverkennbar; bis 7 Proz. Acetaldehyd wurden beobachtet.

Über die Bildung von Acetaldehyd beim bakteriellen Abbau von Säuren der Kohlenhydratreihe und verwandten Säuren.

Von

K. Nagai.

(Aus dem Kaiser Wilhelm-Institut für experimentelle Therapie und Biochemie in Berlin-Dahlem.)

(Eingegangen am 11. Juli 1923.)

Wie in der voranstehenden Mitteilung[1]) erwähnt ist, kann Acetaldehyd nicht nur aus zahlreichen Kohlenhydraten, sondern auch aus den zugehörigen Alkoholen hervorgehen, so aus Mannit und Glycerin. Im nachstehenden beschreibe ich Versuche, welche zeigen, daß eine erfolgreiche *Anwendung des. Abfangverfahrens* von *Neuberg-Färber-Reinfurth auf die Vorgänge beim bakteriellen Abbau verschiedener Säuren* gleichfalls möglich ist.

Geprüft habe ich eine Anzahl von Säuren, die teils direkt Abkömmlinge der Zuckerarten verschiedener Reihen darstellen, teils als Naturprodukte wichtig sind, nämlich die *Äpfelsäure*, die *d-Gluconsäure*, die *d-Glycerinsäure*, die *d, l-Milchsäure* sowie die *d-Weinsäure*.

Die genannten sauren Substanzen kamen in Form von Salzen, und zwar als Kalksalze oder Alkaliverbindungen, zur Anwendung. In allen Ansätzen brauchte ich als Nährlösung Hefewasser und als Stickstoffzugabe Ammoniumsulfat. Als Erreger der Gärungen benutzte ich B. coli und B. lactis aerogenes. Als Abfangmittel diente überall Dinatriumsulfit unter Zugabe von kohlensaurem Kalk. In Abwesenheit des Abfangmittels entstand, wie ich mich überzeugt habe, kein Aldehyd. Sämtliche genannten Säuren bildeten unter den angegebenen Bedingungen Acetaldehyd. Quantitative Untersuchungen habe ich bei der Gluconsäure, Glycerinsäure und Milchsäure vorgenommen, während ich mich bei der Äpfelsäure und der Weinsäure auf qualitative Proben beschränkte.

---

[1]) *K. Nagai*, diese Zeitschr. **141**, 261, 1923.

Im einzelnen ging ich folgendermaßen vor:

1. 100 ccm Hefewasser, 2 g *Äpfelsäure*, 0,5 g Ammoniumsulfat sterilisiert und mit 2 g keimfreier Kreide versetzt. Nach eingetretener Neutralisation Zugabe von 7,5 ccm 25proz. Na_2SO_3 sowie von 6 g keimfreiem Calciumcarbonat. Nach kräftigem Umschütteln und mehrstündigem Stehen der Mischung erfolgt Impfung mit drei Ösen B. coli. Nach 2 Tagen deutliche Aldehydprobe, die nach 6 Tagen schwach wurde.

2. Genau gleicher Ansatz mit *Äpfelsäure* und den erwähnten Materialien. Beimpfung mit drei Ösen B. lactis aerogenes. Nach 2 Tagen deutliche, nach 5 Tagen schwächer gewordene Aldehydreaktion.

3. 100 ccm Hefewasser, 2 g *Dikalium-tartrat*, 0,5 g Ammoniumsulfat, 6 g kohlensaurer Kalk, 7,5 ccm 25proz. Na_2SO_3. Beimpfung mit drei Ösen B. coli. Nach 7 Tagen spurenhafte Bildung von Acetaldehyd.

4. Ansatz wie 3., Beimpfung mit B. lactis aerogenes. Nach 3 Tagen schwache Probe auf Acetaldehyd, die nach einer Woche kräftig wurde.

Sulfitfreie Kontrollversuche zu den Ansätzen 1 bis 4 enthielten nach gleichen Zeiten keinen Acetaldehyd.

5. 4 g *Seignettesalz*, 100 ccm Hefewasser, 0,5 g Ammoniumsulfat, 6 g kohlensaurer Kalk, 7,5 ccm 25proz. Dinatriumsulfit. Nach Beimpfung mit B. coli innerhalb 3 Tagen mäßige Aldehydreaktion, die nach weiteren 4 Tagen nur noch angedeutet war.

6. Entsprechender Ansatz mit 4 g *Seignettesalz*, Beimpfung mit B. lactis aerogenes. Nach 3 Tagen deutliche, nach 5 Tagen mittelstarke, nach 7 Tagen kräftige Aldehydreaktion.

Kontrollansätze mit 4 g Seignettesalz ohne Beigabe von schwefligsaurem Natrium entwickelten keinen Acetaldehyd.

Von der Wiedergabe der qualitativen Proben mit milchsauren, gluconsauren und glycerinsauren Salzen nehme ich Abstand und führe die zahlenmäßigen Belege für die quantitativ durchgeführten Experimente an. Dieselben sind als Reihenversuche angelegt, und die nachfolgenden Tabellen weisen aus, daß bei der Verwendung der Kalksalze dieser Säuren als Substrat die Menge des Acetaldehyds anstieg, um dann wieder abzunehmen.

Gluconsäure:

7. 20 g gluconsaures Calcium, 1000 ccm Hefewasser, 5 g Ammoniumsulfat. Nach Sterilisation an drei aufeinander folgenden Tagen Zugabe von 60 g keimfreiem kohlensauren Kalk sowie von 75 ccm 25proz. Dinatriumsulfitlösung. Beimpfung mit 20 Ösen einer Kultur von B. lactis aerogenes. Die Bestimmung des Acetaldehyds erfolgte in je 100 ccm Gärgut.

Nach Tagen	mg Acetaldehyd in 100 ccm Gärgut
5	39
9	54
16	47

Glycerinsäure:

8. Ansatz mit 20 g glycerinsaurem Calcium in 1000 ccm Hefewasser, Zugabe von 5 g Ammoniumsulfat, 60 g kohlensaurem Kalk und 75 ccm der Dinatriumsulfitlösung. Einsaat von B. lactis aerogenes.

Nach Tagen	mg Acetaldehyd in 100 ccm Gärgut
5	30
9	43
16	48
20	9

Milchsäure:

9. 10 g Calciumlactat, 500 ccm Hefewasser, 2,5 g Ammoniumsulfat, 30 g Kreide, 37,5 ccm 25 proz. Lösung von sekundärem schwefligsauren Natrium. Beimpfung mit 15 Ösen B. lactis aerogenes.

Nach Tagen	mg Acetaldehyd in 100 ccm Gärgut
10	33
14	48
20	14

Aus den mitgeteilten Daten ergibt sich, daß auch die Säuren der Kohlenhydratreihe und die ihnen so nahe verwandte Milchsäure nicht ganz unbedeutende Mengen Acetaldehyd liefern können, wenn ihre Salze in Gegenwart eines Abfangmittels durch Bakterien abgebaut werden.

Über den vermeintlichen Kolloidcharakter der Lösungen des Chloroforms und einiger seiner Verwandten.

Von

Panchanan Bose.

(Aus dem pharmakologischen Institut der Universität Berlin.)

(Eingegangen am 10. Juli 1923.)

Mit 1 Abbildung im Text.

Experimentell läßt sich zeigen, daß die frühere Annahme von *Traube* (1) und seiner Schüler, wonach eine Chloroformlösung bei der Messung der Oberflächenspannung deshalb keinen Ausschlag gibt, weil Chloroform als flüchtige Substanz in die Luft diosmiert, nicht richtig sein kann. *Joachimoglu* (2) konnte zeigen, daß eine Chloroformlösung, die ein Stalagmometer passiert hat, Chloroform in erheblichen Mengen enthält, was man sowohl chemisch als auch pharmakologisch leicht nachweisen kann. Auch eine Reihe von Halogenderivaten des Äthans, Methans und Äthylens (Dichlormethan, Tetrachlormethan, Äthylendichlorid, Äthylidenchlorid, Tetrachloräthan, Dichloräthylen, Trichloräthylen, Pentachloräthan, Hexachloräthan, Tetrachloräthan, Bromoform usw.) beeinflussen die Oberflächenspannung des Wassers nicht. Jedenfalls läßt sich bei der gewöhnlichen Messung durch Stalagmometer eine Veränderung dieser physikalischen Größe nicht nachweisen. Aus diesen Befunden wurde von *Joachimoglu* der Schluß gezogen, daß die *Traube*sche Narkosetheorie auf die hier erwähnten Verbindungen nicht angewandt werden kann. Es zeigte sich weiter, daß auch andere Vertreter der Narkotica der Fettreihe nicht zu den kapillaraktiven Körpern gerechnet werden können, denn *Fühner* (3) konnte nachweisen, daß Lösungen von Pentan, Hexan und Octan die Oberflächenspannung des Wassers nicht beeinflussen.

Um diesen Schwierigkeiten aus dem Wege zu gehen, nehmen *Traube* und *Klein* (4) an, daß Lösungen des Chloroforms und anderer Narkotica der Fettreihe kolloider Natur sind. Insbesondere wird angenommen, daß es sich hier um kolloide Lösungen handelt, weil im Ultramikroskop submikrone Teilchen zu sehen waren.

Es gibt eine Reihe von Kriterien, um zu entscheiden, ob es sich bei einer gegebenen Lösung um ein molekulardisperses System oder um ein kolloides System handelt. Es ist immer gewagt, lediglich auf Grund einer physikalischen Eigenschaft die Entscheidung zu treffen, ob der betreffende Stoff molekulardispers oder kolloid gelöst ist.

Molekulardisperse Lösungen unterscheiden sich von kolloidalen Lösungen durch folgende Eigenschaften:

a) Optisches Verhalten:
   1. Tyndalleffekt.
   2. Ultramikroskop.
b) Gefrierpunktserniedrigung.
c) Diffusionsvermögen:
   1. in Gallerten,
   2. durch Membranen.
d) Verhalten bei der Ultrafiltration.

Es ist mir von Prof. *Joachimoglu* die Aufgabe gestellt worden, auf Grund des Gesagten experimentell zu prüfen, ob die Lösungen des Chloroforms und seiner Verwandten als molekulardisperse oder als kolloide anzusehen sind.

I. Tyndallphänomen.

Für diese und die folgenden Versuche wurden Lösungen mit folgenden Konzentrationen benutzt:

Tabelle I.

	In 1 Liter Wasser	
	ccm	g
Chloroform $CHCl_3$	5,0	7,445
Dichlormethan CH_2Cl_2	10,0	13,22
Tetrachlormethan CCl_4	0,5	0,8
Äthylendichlorid $\begin{matrix}CH_2Cl\\CH_2Cl\end{matrix}$	6,8	8,51
Tetrachloräthan $\begin{matrix}CHCl_2\\CHCl_2\end{matrix}$	1,25	2,0

Durch eine frisch bereitete Chloroformlösung wurde ein Lichtkegel geschickt und durch ein *Nicoll*sches Prisma betrachtet. Es läßt sich feststellen, daß sowohl die Lösungen des Chloroforms wie auch die Lösungen des Dichlormethans, Tetrachlorkohlenstoffs, Äthylendichlorids, Tetrachloräthans keinen Tyndalleffekt zeigen, während eine unter genau denselben Bedingungen geprüfte kolloidale Eisenlösung (Elektroferrol) ein sehr deutliches Tyndallphänomen aufwies.

II. Ultramikroskop.

Benutzt wurde ein Spaltultramikroskop nach *Siedentopf* und *Zsigmondy* mit Küvetteneinrichtung. Füllte man die Küvette mit reinem destillierten Wasser, so konnten im Gesichtsfeld zwei oder drei Teilchen sichtbar gemacht werden. Setzte man eine Elektroferrollösung zu, so waren die Teilchen kaum

zu zählen. Nun wurde, ohne den Apparat zu verändern, die Elektroferrollösung mit destilliertem Wasser ausgespült, bis sich so viel Teilchen zeigten, wie vorher beim destillierten Wasser. Brachte man nun in die Küvette eine Chloroformlösung, so war eine Vermehrung der Zahl der Teilchen nicht festzustellen, und ebenso verhielten sich die Lösungen von Dichlormethan, Tetrachlormethan, Äthylendichlorid, Tetrachloräthan. Zur Vermeidung von Irrtümern und Mißverständnissen möchten wir darauf hinweisen, daß unsere Lösungen vollkommen klar waren, d. h. ungelöste Tröpfchen nicht enthielten. Zwischen frisch hergestellten Lösungen und solchen, die einige Tage alt waren, ergab die ultramikroskopische Betrachtung keinen Unterschied.

III. Gefrierpunktserniedrigung[1]).

Diese Prüfung wurde in bekannter Weise mit dem *Beckmann*schen Thermometer ausgeführt. In folgender Tabelle sind die experimentell gefundenen und theoretisch berechneten Werte zusammengestellt.

Tabelle II.

	Gefundene Werte	Berechnete Werte
Chloroformlösung	— 0,145	— 0,15
Dichlormethanlösung	— 0,269	— 0,277
Tetrachlorkohlenstofflösung	— 0,01	— 0,0097
Tetrachloräthanlösung	— 0,025	— 0,022
Äthylendichloridlösung	— 0,138	— 0,14

IV. Diffusion in Gelatine.

Eine 15proz. Gelatinelösung wurde in eine viereckige Schale (10 × 10 cm) in einer 5 cm hohen Schicht gegossen. Nachdem die Gelatine erstarrt war, wurde sie mit einer 3 cm hohen Schicht von Chloroformlösung überschichtet. Nach 18 Stunden wurde die Chloroformlösung entfernt, die Oberfläche der Gelatine mit destilliertem Wasser gewaschen, die Gelatine aus der Schale herausgenommen und durch drei, parallel zur Oberfläche gehende Schnitte, wie nebenstehende Zeichnung illustriert, in 4 Schichten *A*, *B*, *C* und *D* geteilt. Zur Untersuchung auf Chloroform wurden die Schichten *A*, *B* und *C* verwendet. Die Gelatine wurde zerkleinert und mit Wasser geschüttelt. Die wässerige Lösung wurde auf Chloroform untersucht. Mit der Isonitrilprobe ließen sich in drei Schichten, *A*, *B*, *C*, Chloroform nachweisen.

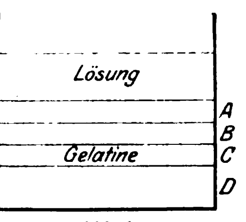


Abb. 1.
A, *B*, *C* je 1 cm hohe Schicht.
D = 2 cm hohe Schicht.

Da für die anderen Stoffe, Dichlormethan, Tetrachlormethan, Äthylendichlorid, Tetrachloräthan, derartige charakteristische Reaktionen nicht existieren, haben wir uns damit begnügt, Chlor nachzuweisen. Zu diesem

[1]) Es sei darauf hingewiesen, daß *L. Michaelis* in der Sitzung der Berl. Physiol. Ges. vom 15. Juli 1921 in einer Diskussionsbemerkung im Anschluß an einen Vortrag von *Traube* erwähnt hat, daß Chloroform den Gefrierpunkt des Wassers so beeinflußt, wie es von einem molekulardispersen gelösten Stoff zu erwarten ist. (Mündliche Mitteilung von Prof. *Joachimoglu.*)

Zwecke haben wir die nach dem Zerkleinern und Ausziehen mit Wasser erhaltene wässerige Lösung der Chlorverbindung der Destillation unterworfen. Bei der Flüchtigkeit dieser Körper mußte die Destillation mit besonderer Vorsicht vorgenommen werden. Als Vorlage benutzten wir ein von *Stock* angegebenes Gefäß, welches auch für die Isolierung des Benzols aus Organen früher gute Dienste geleistet hat (5).

Die Vorlage enthielt gesättigte alkoholische Natronlauge. Nach beendeter Destillation wurde der Inhalt der Vorlage erhitzt, vorsichtig mit Salpetersäure angesäuert und mit $AgNO_3$-Lösung versetzt. Ein Niederschlag von AgCl zeigte uns an, daß in die Gelatine das betreffende Chlorderivat diffundiert war, da Kontrolluntersuchungen bei reiner Gelatine niemals einen Niederschlag von AgCl gegeben haben. Nach diesem Verfahren konnten wir sowohl bei Dichlormethan als auch bei Tetrachloräthan, Äthylendichlorid eine Diffusion nachweisen, während der Nachweis bei Tetrachlormethan uns nicht gelungen ist. Dies ist wohl auf die geringe Löslichkeit dieser Verbindung in Wasser zurückzuführen.

V. Diffusion durch Membranen.

Zu diesen Versuchen benutzten wir Diffusionshülsen von *Schleicher* und *Schüll* Nr. 579 (Durchmesser 16 mm, Höhe 100 mm). Die wässerige Lösung der Chlorderivate wurde gegen destilliertes Wasser bei gewöhnlicher Temperatur 12 Stunden lang dialysiert. Zum Nachweis des Chloroforms in der Außenflüssigkeit benutzten wir auch hier die Isonitrilprobe, die anderen Derivate ließen sich nach dem Versetzen der wässerigen Lösungen mit alkoholischer Natronlauge, Erhitzen, Ansäuern mit Salpetersäure mit $AgNO_3$-Lösung nachweisen. Geprüft wurden außer Chloroform Dichlormethan, Tetrachlorkohlenstoff, Äthylendichlorid und Tetrachloräthan; alle zeigten ein positives Resultat.

Was die Geschwindigkeit der Diffusion anbelangt, die für die Beurteilung, ob es sich um molekulardisperse oder kolloide Lösungen handelt, wichtig ist, so haben wir auch in dieser Richtung Versuche unternommen. Bei Chloroform konnte nachgewiesen werden, daß bei Dialysieren der gesättigten Lösung gegen destilliertes Wasser bereits nach 10 Minuten Chloroform in der Außenflüssigkeit nachweisbar ist.

VI. Ultrafiltration.

Es wurde ein Kollodiumfilter nach *Ostwald* hergestellt. Um seine Brauchbarkeit nachzuweisen, benutzten wir ein Mastixsol. Die Teilchen wurden hier zurückgehalten, während bei Chloroform, Dichlormethan, Tetrachlorkohlenstoff, Äthylendichlorid und Tetrachloräthan der Nachweis im Filtrat nach den oben geschilderten Proben ohne weiteres gelang.

Schlußfolgerung.

Die Versuche zeigen, daß Chloroform und die oben erwähnten Verwandten dieses Körpers in ihren wässerigen Lösungen sich als molekulardisperse Körper verhalten. Die Annahme *Traubes*, daß sie die Oberflächenspannung des Wassers nicht verändern, weil sie in kolloider Form gelöst sind, läßt sich demnach experimentell nicht stützen.

Was die Bedeutung dieser Versuche für die Narkosetheorien anbelangt, so ergibt sich daraus, daß die Schwierigkeit, die auf Grund des Verhaltens in bezug auf die Oberflächenspannung besteht, vorläufig nicht beseitigt werden kann. *Traube* (a. a. O.) nimmt an: „Eine Lösung von Chlorkohlenstoff in Wasser ist eine mit bloßem Auge unsichtbare Emulsion, lediglich von Submikronen und vielleicht nicht einmal Amikronen, denn wären Amikronen oder gar molekulardisperse Teilchen vorhanden, so würde die Lösung bei der Stalagmometeruntersuchung sich als oberflächenaktiv erwiesen haben." Diese Annahme kann nicht richtig sein. Es muß nach dem oben geschilderten Verfahren gelingen, nachzuweisen, daß Chloroform sich in kolloidaler Form löst. Aus der Tatsache, daß eine Oberflächenaktivität bei Chloroform nicht nachweisbar ist, ist man nicht berechtigt, den Schluß zu ziehen, daß es in kolloidaler Form vorhanden sein muß.

Literatur.

1) *Traube*, Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. **153**, 307, 1913. — 2) *Joachimoglu*, diese Zeitschr. **120**, 210. — 3) *Fühner*, ebendaselbst **115**, 259. — 4) *Traube* und *P. Klein*, diese Zeitschr. Experimentelle Beiträge zur Theorie der Narkose **120**, 111. — 5) *Joachimoglu*, diese Zeitschr. **70**, 97. 1915.

Über einen Schwefelsäure-ester der Stärke.

Von

R. Tamba.

(Aus dem Kaiser Wilhelm-Institut für experimentelle Therapie und Biochemie in Berlin-Dahlem.)

(*Eingegangen am 10. Juli 1923.*)

Seit längerer Zeit weiß man, daß Schwefelsäure-ester der einfachen Zuckerarten in der Natur vorkommen. Neuerdings ist nun festgestellt, daß auch Schwefelsäureverbindungen höher molekularer Kohlenhydrate im Pflanzenreiche auftreten. *C. Neuberg* und *H. Ohle*[1]) haben gezeigt, daß der Agar eine solche Polysaccharid-schwefelsäure ist. Zu dem gleichen Ergebnis ist *M. Samec*[2]) gekommen, und *P. Haas*[3]) sowie *B. Russel-Wells*[4]) haben unter den Schleimstoffen aus Chondrus crispus ebenfalls die Ätherschwefelsäure einer Polyose beobachtet.

Bei dieser Sachlage schien es nun an der Zeit, Synthesen von Polysaccharid-schwefelsäuren auszuführen. Für den künstlichen Aufbau von Schwefelsäure-estern der niederen Zuckerarten haben *C. Neuberg* und Mitarbeiter eine Reihe von Verfahren angegeben. Sie bestehen hauptsächlich in der Einwirkung von Chlorsulfonsäure auf die Zuckerarten in Gegenwart säurebindender Mittel. Durch zweckentsprechendes Vorgehen kann man auf diesem Wege auch Schwefelsäure in das Molekül der Stärke einführen. Zu einer Verbindung, die allem Anscheine nach als eine *Amylo-dischwefelsäure* aufzufassen ist, gelangte ich auf die folgende, mir von Prof. *Neuberg* empfohlene Arbeitsweise.

In einen mit zwei Öffnungen versehenen Glaskolben brachte ich 100 ccm wasserfreies Pyridin und ließ unter Kühlung langsam ein Gemisch von 13,3 ccm Chlorsulfonsäure und 30 ccm absolutem Chloroform eintropfen. Diese Zugabe erfolgte durch einen mit Chlorcalciumrohr versehenen Tropftrichter, während die andere Öffnung

---

1) *Neuberg* und *Ohle*, diese Zeitschr. **125**, 311, 1921.
2) *Samec*, Chem. Centralbl. **1922**, I, 1113.
3) *Haas*, ebendaselbst **1921**, III, 1248.
4) *Russel-Wells*, Biochem. Journ. **16**, 578, 1922.

gleichfalls mit einem Chlorcalciumrohr verbunden war. Wurde beim Zusammenbringen der Ingredienzien kräftig geschüttelt, so war der sich bildende Niederschlag so fein verteilt, daß er bei gelindem Erwärmen vollkommen in Lösung ging.

Die homogene Flüssigkeit wurde sodann in ein starkwandiges größeres Reagenzglas übergeführt. Dieses war mit einem gut passenden Korkstopfen verschlossen, der drei Durchbohrungen besaß: eine für den mit Quecksilber abgedichteten Rührer, eine zweite für ein Chlorcalciumrohr und eine dritte für einen weithalsigen Trichter. Letzterer war durch einen Gummischlauch auf einem in das Reagenzglas hineinragenden Glasrohr befestigt; der verbindende Gummischlauch konnte durch eine Klemmschraube verschlossen werden.

Das Reagenzrohr wurde in ein siedendes Wasserbad getaucht und der Inhalt mittels einer Turbine lebhaft gerührt. Durch den Trichter wurden dann in kleinen Anteilen 10,8 g reinste Stärke hineingebracht, die zuvor im Hochvakuum vollkommen getrocknet und fein gepulvert war.

Bei Zugabe der Stärke ist dafür Sorge zu tragen, daß dieselbe nicht an den Wandungen des Reagenzglases haften bleibt, sondern in die Pyridinlösung des Chlorsulfonsäure-additionsproduktes gelangt. Nach beendigtem Eintragen der Stärke, das 2 Stunden Zeit erforderte, wurde noch 2 bis 3 Stunden lang unter dauerndem Turbinieren im Wasserbade erwärmt. Am Boden des Gefäßes befand sich nunmehr eine zusammengeballte zähe, schleimige Masse. Von dieser goß man die überstehende Flüssigkeit ab, darauf wusch und knetete man das Reaktionsprodukt mit absolutem Methylalkohol. Dieser nahm anhaftendes Pyridin-chlorsulfonat und -chlorhydrat auf. Die Behandlung mit dem Holzgeist ist solange fortzusetzen, bis kein Halogen oder anorganischer Schwefel mehr extrahiert wird. Dabei wurde zugleich die anfänglich schleimige Stärkeverbindung fest, blieb jedoch zunächst noch hygroskopisch. Sie wurde jetzt mit 2 Litern destillierten Wassers behandelt; hierin löste sich die durch Sulfurylierung gebildete Amylo-schwefelsäure, während unveränderte Stärke sich innerhalb 2 Tagen absetzte. Man dekantierte alsdann auf einen Trichter, wusch den Niederschlag mit etwas kaltem Wasser aus und engte die Lösung im Vakuum (unterhalb 40°) auf ein kleines Volumen ein. Die restierende Lösung ließ ich in absoluten Alkohol eintropfen und saugte die entstandene Fällung ab. Nach Auswaschen mit absolutem Alkohol betrug die Ausbeute etwa 8 g.

Der so erhaltene Körper muß frei von Chlor und anorganischen Sulfaten sein. Er enthält jedoch reichlich organisch gebundene Schwefelsäure, deren Menge durch eine Soda-Salpeter-Schmelze und nachherige Fällung in Form von Bariumsulfat ermittelt wird. In dem Produkte, einem Pyridinsalz oder -Aggregat, wurden bei verschiedenen Ansätzen

12,6 bis 13,3 Proz. Schwefel gefunden. Auf Grund dieser Analysen wurde die Substanz in ihr Kaliumsalz übergeführt, und zwar so, daß auf 1 Mol. Schwefel 1 Mol. Kaliumhydroxyd verwendet wurde.

Zur Umwandlung in das Kaliumsalz wurden 7,8 g der Stärkeschwefelsäure in 50 ccm Wasser gelöst und mit einer frisch bereiteten Lösung von 1,82 g KOH in 25 ccm Alkohol versetzt. Darauf wurde noch so lange absoluter Alkohol hinzugefügt, bis sich die körnige Ausscheidung des Kaliumsalzes nicht mehr vermehrte. Dasselbe wurde abgesaugt und mit wasserfreiem Alkohol gewaschen, bis die Substanz nicht mehr nach Pyridin roch und der abfließende Weingeist nicht mehr alkalisch reagierte. Das auf diese Weise dargestellte Kaliumsalz ist nicht hygroskopisch und kann im Hochvakuum bei 78° (Alkoholdampf im Heizmantel) über Phoshphorpentoxyd zur völligen Konstanz getrocknet werden.

Durch die Behandlung mit alkoholischer Kalilauge tritt keine Verseifung ein. Alle Schwefelsäure befindet sich in organischer Verbindung mit der Stärke.

Zur Analyse wurde, da die Schwefelsäure sehr fest haftet, am einfachsten mit Soda und Salpeter geschmolzen, während das Kalium durch Abrauchen mit Schwefelsäure bestimmt wurde.

0,1676 g	Substanz lieferten	0,0628 g K_2SO_4 =	16,81	Proz.	K.
0,1564 g	,, ,,	0,0584 g K_2SO_4 =	16,75	,,	K,
0,1916 g	,, ,,	0,1988 g $BaSO_4$ =	14,22	,,	S,
0,0702 g	,, ,,	0,0741 g $BaSO_4$ =	14,34	,,	S.

Die Analyse der Substanz stimmt einigermaßen auf die Formel: $C_6H_8O_5(SO_3)_2K_2 + 2^1/_2\,H_2O$. Ein Körper von dieser Zusammensetzung würde 17,60 Proz. Kalium und 14,44 Proz. Schwefel enthalten.

Unzweifelhaft ist die Verbindung ein Schwefelsäure-ester der Stärke; er besitzt folgende Eigenschaften. Die Lösung in Wasser ist neutral gegen Lackmus. Auf Zufügung von Salzsäure und Chlorbarium bleibt sie klar. Erst bei anhaltendem Kochen mit starker Salzsäure wird langsam Schwefelsäure abgespalten. Die Loslösung der Schwefelsäure gelingt schnell nach dem Verfahren von *Mandel* und *Neuberg*[1], d. h. bei einem Erwärmen der wässerigen Lösung mit 30proz. Wasserstoffsuperoxyd unter Beigabe von Chlorbarium, Salzsäure sowie einer Spur Eisennitrat als Katalysator.

Bariumchlorid bringt in der konzentrierten wässerigen Lösung des amyloschwefelsauren Kaliums einen Niederschlag hervor, der sich in Salzsäure löst. Mit Calciumchlorid, Magnesiumsulfat, Kupfersulfat und Bleiacetat entstehen keine Fällungen; Bleiessig bewirkt einen gelatinösen Niederschlag, der auf Zugabe von Ammoniak mehr pulverförmig

[1]) *Mandel* und *Neuberg*, diese Zeitschr. 71, 196, 1915.

wird. Bleizucker und Ammoniak liefern gleichfalls eine schwer lösliche Bleiverbindung, Kupferhydroxyd (erzeugt durch Kupfersulfat+Natronlauge) wird mit blauer Farbe gelöst. *Fehling*sche Mischung wird von der Substanz direkt nicht, wohl aber nach voraufgegangener Hydrolyse mit heißen Mineralsäuren reduziert. Mit Jod-Jodkaliumlösung erfolgt Bläuung. Diese Farbenreaktion ist jedoch auf eine Beimischung von kleinen Mengen unveränderter Stärke zu beziehen, wie sich aus folgendem Verhalten ergibt.

Löst man 2 g Kaliumsalz in 100 ccm Wasser und fügt eine Messerspitze hochwirksamer Takadiastase nebst 1 ccm Toluol hinzu, so wird innerhalb 24 Stunden die anhaftende Stärke verzuckert. Filtriert man nach der Behandlung mit dem Ferment, engt im Vakuum ein und fällt mit absolutem Alkohol, so erhält man einen weißen, in Wasser löslichen Niederschlag, dessen prozentische Zusammensetzung nunmehr eine Änderung und weitgehende Annäherung an obige Formel erfahren hat.

0,2396 g Substanz gaben 0,0952 g K_2SO_4 = 17,82 Proz. K,
0,2272 g „ „ 0,2340 g $BaSO_4$ = 14,15 „ S.

Die von beigemengter gewöhnlicher Stärke befreite und umgefällte Substanz enthielt also Schwefel sowie Kalium in einem Verhältnis, das ziemlich genau der Zusammensetzung des Dikaliumsalzes von Amylo-di-schwefelsäure entsprach. Die Eigenschaften der Verbindung waren unverändert geblieben, nur die Jodreaktion war jetzt völlig verschwunden. Daraus ergibt sich, daß der Schwefelsäure-ester der Stärke nicht mehr befähigt ist, sich mit Jod zu bläuen. Das steht im Einklange mit den im hiesigen Institut gemachten Erfahrungen von *W. v. Kaufmann* und *A. Lewite*[1]), welche gezeigt haben, daß die Besetzung von Hydroxylen im Stärkemolekül die Jodreaktion verhindert.

Schließlich führe ich noch die spezifische Drehung an. Sie war

$$[\alpha]_{D_{19}} = +134{,}5^0$$
$$(\alpha = 1{,}03^0,\ l = 1,\ c = 0{,}766).$$

[1]) *v. Kaufmann* und *Lewite*, Ber. **52**, 616, 1919.

Studien
über das Verhalten der wichtigsten Kohlenhydrate (Glucose, Galaktose, Fructose, Mannose, Maltose, Lactose, Saccharose) in stark saurer alkalischer sulfit- und bisulfithaltiger Lösung.

III. Mitteilung:

Die Einwirkung von Alkalien auf die Kohlenhydrate; die Einwirkung von Natriumsulfit auf die Kohlenhydrate, insbesondere auf Glucose; die Einwirkung von Natriumbisulfit auf die Kohlenhydrate.

Von

B. Bleyer und **H. Schmidt.**

(Aus dem chemischen Laboratorium der wissenschaftlichen Zweigstelle München der chemischen Fabriken Merck, Boehringer, Knoll.)

(Eingegangen am 11. Juli 1923.)

Mit 3 Abbildungen im Text.

Die Einwirkung von Alkalien auf die Kohlenhydrate.

Gegen Hydroxylionen sind die Kohlenhydrate bedeutend empfindlicher als gegen Wasserstoffionen.

So kann die Mutarotation schon durch Zugabe geringer Mengen von Alkalien — einige Tropfen Ammoniak genügen — augenblicklich zerstört werden. Stärkere Alkalien bauen die Kohlenhydrate meist unter Verfärbung weitgehend ab. Ein häufiges Spaltprodukt ist die Milchsäure; daneben kommt es aber auch oft zur Bildung von Substanzen, die *Nef*[1]), der Hauptbearbeiter dieses Gebietes, mit dem Namen Saccharine bezeichnet hat. Zu den interessantesten Arbeiten auf diesem Gebiete gehören die Untersuchungen von *Lobry de Bruyn* und *van Eckenstein*[2]). Diese beiden Forscher fanden, daß die Kohlenhydrate, besonders aber die Hexosen und Pentosen, unter Einwirkung verdünnter Alkalien oder alkalisch reagierender Salze wechselseitig ineinander überzugehen vermögen. So bildet sich aus Glucose unter Umlagerung der

$$\begin{array}{l} HC = O \\ | \\ HCOH \\ \vdots \end{array} \text{-Gruppe}$$

ein Gleichgewichtszustand mit Fructose und Mannose aus. Aber auch die Fructose und Mannose streben in verdünnter alkalischer Lösung diesen Gleichgewichtszustand an, der wahrscheinlich über allen drei Zuckern gemeinsame, von *Wohl* und *Neuberg*[3]) aufgestellte Enolform —COH=CHOH erreicht wird.

---

[1]) *Nef*, Liebigs Annalen **357**, 294, 1907; **376**, 89, 1910.

[2]) *Lobry de Bruyn* und *van Eckenstein*, Ber. **28**, 3078, 1895.

[3]) *Wohl* und *Neuberg*, Ber. **33**, 3095, 1900.

Angeregt durch das Verhalten, das die Zucker in saurer Lösung zeigten, versuchten wir festzustellen, ob nicht auch in alkalischer Lösung ähnliche Gesetzmäßigkeiten herrschen. Es ist ja schon lange bekannt, daß Alkalien selbst in großer Verdünnung eine Depression der spezifischen Drehung bewirken. Es war zu vermuten, daß dabei vielleicht primär eine Verschiebung des Gleichgewichtes zugunsten der niedrig drehenden Form eintritt. Die näheren Untersuchungen haben diesen Schluß gerechtfertigt. Wenn man z. B. Glucose in Normal-Natronlauge löst, so ist neben dem augenblicklichen Abklingen der Mutarotation eine Erniedrigung der spezifischen Drehung zu beobachten, die sicher nicht durch chemische Umsetzungen erklärt werden kann. Die durch chemische Einwirkung hervorgerufenen Drehungsänderungen machen sich selbst bei stärkstem Alkali erst nach längerer Zeit in einer langsamen Abnahme der Drehung bemerkbar. Wie bei der Einwirkung von Säuren hat man auch hier zwischen Mutarotation, primären Drehungsänderungen (Gleichgewichtsverschiebungen) und sekundären Änderungen (chemische Einwirkung des Lösungsmittels) zu unterscheiden. Die auftretenden Erscheinungen erfolgen nach der anderen Seite und wegen der großen Empfindlichkeit der Zucker auch schon bei geringerer Konzentration der Lösung an OH-Ionen. Die Untersuchungen erstreckten sich in der Hauptsache auf Glucose und Galaktose und Lactose.

1. Versuch. Angewandte Substanz: 0,75 g Lactose werden in 25 ccm 10n Natronlauge unter Schütteln gelöst. Die Lösung ist vollständig klar, und es findet auch innerhalb 20 Stunden nur geringe Verfärbung statt. Rohrlänge 2 dm. Versuchstemperatur 16 bis 17°.

Zeit Minuten	Winkel Grad	Spez. Drehung Grad	Zeit Minuten	Winkel Grad	Spez. Drehung Grad
2	1,80	30,0	70	1,50	25,0
10	1,80	30,0	120	1,10	18,3
20	1,80	30,0	∞	0,00	—
40	1,70	28,3			

Das Verhalten der Lactose in stark alkalischer Lösung zeigt wie in stark saurer Lösung Anomalien. Hier findet innerhalb der ersten Minuten nach dem Auflösen eine bedeutende Erhöhung, dort eine Erniedrigung der Drehung statt. Die Anfangsdrehung von 1,8° bleibt längere Zeit konstant, um dann erst langsam innerhalb eines Tages auf Null herabzusinken. Die Verfärbung, die dabei auftritt, ist gering. Es soll noch darauf hingewiesen werden, daß die Anfangsdrehung $\alpha = 30{,}0^0$ der alkalischen Lösung sehr nahe mit der spezifischen Drehung der β-Lactose ($\alpha = 32$ bis 35^0) übereinstimmt.

2. Versuch. Angewandte Substanz: 0,75 g Lactose zeigen, unter den nämlichen Bedingungen wie vorher in 25 ccm einer 5n Natronlauge gelöst, folgende Drehung. Rohrlänge 2 dm. Versuchstemperatur 16 bis 17°.

Zeit Minuten	Winkel Grad	Spez. Drehung Grad	Zeit Minuten	Winkel Grad	Spez. Drehung Grad
5	2,20	36,7	60	1,90	31,7
10	2,20	36,7	135	1,60	26,7
30	2,10	35,0	∞	0,00	—

Die spezifische Drehung der Lactose ist also nicht nur eine Funktion der Säurekonzentration, sondern auch, wie obenstehende Resultate zeigen, der Laugenkonzentration, und zwar findet hier bei fallender Konzentration an OH-Ionen ein Steigen des Drehungswertes statt.

3. Versuch. Angewandte Substanz: 2 g Lactose werden in 25 ccm Normal-Natronlauge gelöst. Rohrlänge: 2 dm. Versuchstemperatur: 16 bis 17°.

Zeit Minuten	Winkel Grad	Spez. Drehung Grad
5	6,50	40,6
30	6,50	40,6

Auch hier zeigt sich durch Erhöhung der spezifischen Drehung die Abhängigkeit von der Laugenkonzentration.

Wenn diese primären Drehungserniedrigungen nur durch eine Verschiebung des Gleichgewichtes zugunsten der niedrig drehenden Form bedingt sind und nicht durch chemische Umsetzung oder Isomerisation, so muß die Lösung nach dem Neutralisieren der Lauge mit Säure wieder die normale spezifische Drehung zeigen. Zu diesem Zwecke haben wir nachfolgende Versuche ausgeführt, die die Richtigkeit dieser Annahme bestätigen.

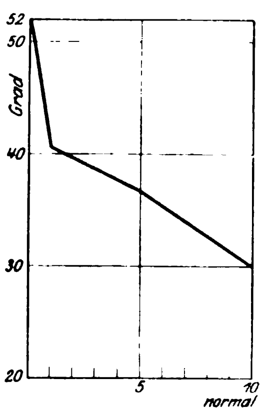


Abb. 1. Abhängigkeit der spez. Drehung der Lactose von der Laugenkonzentration.

4. Versuch. Angewandte Substanz: 2 g Lactose werden in 25 ccm Normal-Natronlauge gelöst. Nach 3 Minuten wird die Lösung auf 50 ccm verdünnt und zeigt nach 5 Minuten im 2-dm-Rohr bei Zimmertemperatur eine Drehung von 3,40°, was einer spezifischen Drehung von 42,5° entspricht.

5. Versuch. Wenn man 1 g Lactose gleich in 25 ccm n/2 Natronlauge löst, so zeigt die Lösung, unter den gleichen Bedingungen beobachtet wie vorher, ebenfalls eine Drehung von 3,4°. Man sieht also, daß durch nachfolgende Verdünnung ebenfalls eine Erhöhung der Drehung bewirkt wird. Das ist aber nur möglich durch Verschiebung des Gleichgewichts zugunsten der höher drehenden Modifikation. Der Übersicht halber ist der Zusammenhang zwischen spezifischer Drehung und Laugenkonzentration in Abb. 1 graphisch dargestellt.

6. Versuch. 2 g Lactose werden in 25 ccm Normal-Natronlauge gelöst, nach 2 Minuten wird die Lösung durch Zusatz von 25 ccm Normal-Salzsäure

neutralisiert. Die nach 5 Minuten erfolgte Polarisation liefert im 2-dm-Rohr bei Zimmertemperatur einen Drehungswert von 4,00°, was einer spezifischen Drehung von $\alpha_D = 50,0°$ entspricht.

Aus vorstehenden Versuchen ersieht man also, daß die Lactosedrehung in hohem Grade von der OH-Ionenkonzentration der Lösung abhängig ist. Mit steigender Laugenkonzentration fällt die spezifische Drehung bis zu einem bestimmten Werte, der der Drehung der **β**-Form des wasserfreien Zuckers sehr nahe kommt. Es ist daher die Vermutung nicht zu gewagt, daß unter dem Einfluß von OH-Ionen das Gleichgewicht nach der Seite der niedrig drehenden Modifikation verschoben wird. Die chemischen Einwirkungen des Lösungsmittels und die damit verbundenen Drehungsabnahmen machen sich erst nach längerer Zeit bemerkbar. Wird eine frisch bereitete Lösung von einer Normal-Natronlauge auf die Hälfte verdünnt, so ist damit ein Steigen der spezifischen Drehung verbunden. Das nämliche Resultat (also eine Rückbildung des gewöhnlichen Gleichgewichtes der verschiedenen Formen) erhält man durch Neutralisation der Säure mit Lauge. Die Drehung kommt dem normalen Werte sehr nahe. Diese Erhöhung der spezifischen Drehung beim Neutralisieren der Säure kann man sehr leicht zeigen, wenn eine Lösung von 2 g Lactose in 10 ccm Natronlauge, die bei Zimmertemperatur im 1-dm-Rohr $\alpha = 7,0°$ dreht, tropfenweise mit konzentrierter Essigsäure oder Schwefelsäure versetzt wird. Dabei steigt entsprechend dem Fortgang der Neutralisation die Drehung langsam an.

Auf Grund dieser Ergebnisse bei der Lactose war es naheliegend, auch die Glucose und die Galaktose in den Kreis der Untersuchungen hereinzuziehen. Vorausschickend erwähnen wir, daß wir bei diesen Zuckern ähnliche Gesetzmäßigkeiten feststellen konnten.

1. Versuch. 1 g Glucose wird in 10 ccm 8 n Natronlauge gelöst. Die Lösung ist schwach gelblich und zeigt 5 Minuten nach dem Auflösen bei Zimmertemperatur im 1-dm-Rohr eine Drehung von 2,60°, nach 45 Minuten eine Drehung von 2,25°, was einer spezifischen Drehung von 26,0 bzw. 22,5° entspricht. Der Wert der Glucose nähert sich also ebenfalls dem Drehungswert der β-Modifikation, der nach *Hudson* bei 20,0° liegt. Auch hier ist es möglich, durch Verdünnen der Lösung ein langsames Ansteigen der Drehung zu beobachten.

1 g Glucose, in 10 ccm Normal-Natronlauge gelöst, zeigt 5 Minuten nach dem Auflösen im 1-dm-Rohr einen Drehungswert von 3,2°. Die spezifische Drehung beträgt also 32,0°; nach dem Verdünnen auf die Hälfte beträgt sie 2,00°, was einer spezifischen Drehung von 40,0° gleichkommt.

1 g Glucose wird in 10 ccm Normal-Natronlauge gelöst. Nach 3 Minuten wird die Lösung durch Zugabe von 10 ccm Normal-Salzsäure neutralisiert. Die Drehung, nach 5 Minuten im 1-dm-Rohr beobachtet, beträgt 4,9° oder $\alpha_D = 49,0°$.

Zu einem ähnlichen Wert der spezifischen Drehung kommt man, wenn die Lösung von 1 g Glucose in 10 ccm Normal-Natronlauge langsam mit konzentrierter Essigsäure neutralisiert wird. Dabei steigt mit dem Fortgang der Neutralisation, obwohl ja die Lösung dadurch etwas verdünnter wird, die Drehung langsam auf einen Wert, der vom normalen Drehungswert nicht weit entfernt ist. Es kann also auch bei der Glucose das Gleichgewicht der stereoisomeren Form durch Variation der OH-Ionenkonzentration zugunsten der höher oder niedrig drehenden Modifikation verschoben werden.

Bei Einhalten dieser Versuchsbedingungen läßt sich auch bei der Galaktose ein ähnlicher Zusammenhang zwischen OH-Ionenkonzentration und der spezifischen Drehung der Lösung feststellen.

Zum Schluß wollen wir noch erwähnen, daß bei Übertragung der Versuche auf die Mannose interessante Ergebnisse zu erwarten sind. Aus Substanzmangel sind wir leider gezwungen, uns die Ausführung dieser Versuche zu versagen. Nach dem Verhalten der Glucose, Lactose und Galaktose in alkalischer Lösung und der Mannose in saurer Lösung ist zu erwarten, daß mit steigender Konzentration an OH-Ionen keine Verminderung der Drehung, sondern eine Erhöhung derselben eintritt, bis zu einem Werte, der dem von *Hudson* für die zweite Modifikation angegebenen Drehungswert $\alpha_D = 34{,}0^0$ sehr nahe kommt.

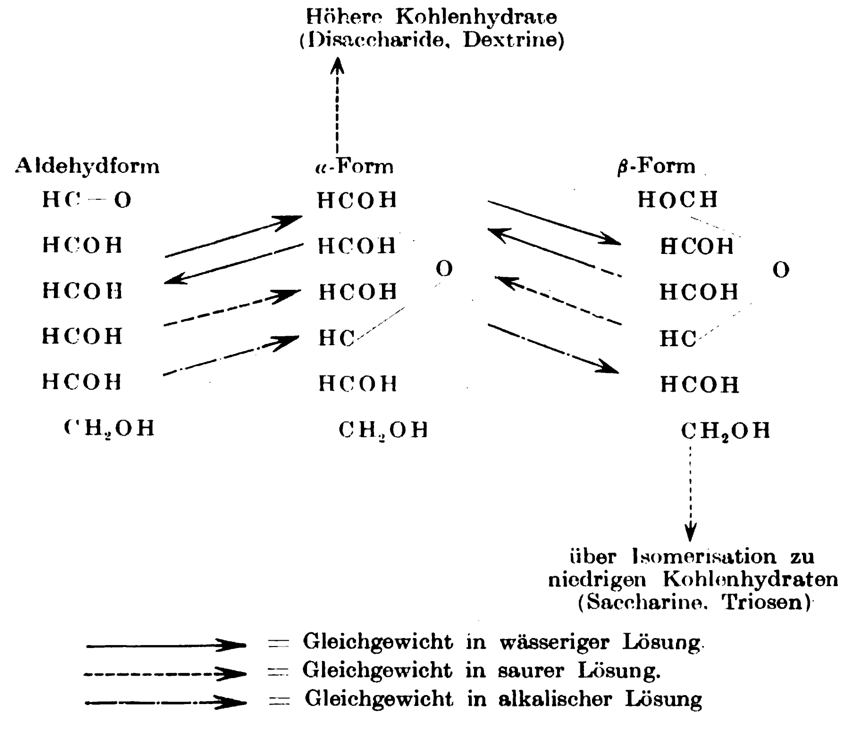
Man kann nun das Gesamtergebnis aus den Hauptabschnitten II und III folgendermaßen formulieren:

Verdünnte Säuren, also Wasserstoffionen, und sehr verdünnte Alkalien, also Hydroxylionen, bewirken nur ein rasches Abklingen der Mutarotation, das bei Alkalien augenblicklich erfolgen kann.

In starker Säurelösung findet dann primär eine Erhöhung der spezifischen Drehung, bedingt durch Verschieben des Gleichgewichtes zugunsten der α-Modifikation, statt. Diesem Vorgange entspricht im alkalischen Medium ebenfalls primär eine Erniedrigung der spezifischen Drehung, bedingt durch Verschieben des Gleichgewichtes zugunsten der β-Modifikation. Sehr starke Säuren bewirken dann noch sekundäre Änderungen, indem durch chemische Einwirkungen des Lösungsmittels bedingte Kondensationen oder Esterbildungen weitere Drehungserhöhungen hervorrufen. Diese Prozesse sind an eine bestimmte Wasserstoffionenkonzentration gebunden. Das Gegenstück dazu bilden auf der anderen Seite die durch stärkere Hydroxylionenkonzentrationen bedingten Isomerisations- und Abbaureaktionen der Zucker. Dabei ist aber zu beachten, daß die Hydroxylionen bereits in geringerer Konzentration wirksam sind als die Wasserstoffionen.

Folgendes Bild wird die obwaltenden Vorgänge noch besser hervortreten lassen. Die Kondensations-, also die Aufbaureaktionen scheinen meist sehr leicht über die α-Form zu gehen, während der β-Modifikation

eine bevorzugte Konstruktion für Abbaureaktionen zukommen muß. Für die Kondensation ist die Gegenwart von Wasserstoffionen, für den Abbau die Gegenwart von Hydroxylionen wichtige Vorbedingung.



Wie wir schon im Schlußkapitel des ersten Abschnittes bei der Lactoseinversion erwähnt haben, geht der alkalische Abbau der Lactose ohne vorherige Spaltung in Galaktose und Lactose vor sich. Man muß daher auf Grund der vorhergehenden Versuche annehmen, daß die β-Form direkt in Glieder mit niederem Kohlenstoffgehalt zerfallen kann. Dabei ist allerdings noch nötig, daß sie zuerst noch in ein isomeres Zwischenprodukt übergeht. Diese letzte Annahme gewinnt an Wahrscheinlichkeit durch die Beobachtung *Emil Fischers*, daß neben α- und β-Methylglucosid auch noch ein von ihm γ-Glucosid genanntes Isomere vorkommt. Es muß zu diesem Glucosid unbedingt auch eine bis jetzt noch nicht bekannte Modifikation der Glucose gehören. Dieser Gedanke hat eigentlich auch den Anlaß zur Ausführung dieser Versuche gegeben. Wir wollten nämlich nicht die im vorstehenden Abschnitt behandelten Drehungsänderungen unter dem Einfluß von Alkalien studieren, sondern auf Grund gewisser, nachher angegebener Vorstellungen über dieses Zwischenprodukt zu einem einwandfreien Ab-

fangen desselben beim Übergange von Glucose in Milchsäure gelangen. Diese Versuche haben bis jetzt noch kein befriedigendes Ergebnis gezeitigt, aber sie gaben den Anstoß zu den in diesem und dem folgenden Abschnitt behandelten Versuchen.

Wir wollen besonders im Hinblick auf die Gärungsversuche *Willstätters* (l. c.) im folgenden unsere Theorie entwickeln: Der β-Glucose gibt man auf Grund zahlreicher experimenteller Ergebnisse folgende Konstitution:

β-Glucose

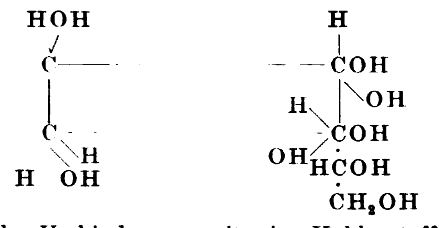
HOCH
HCOH
HOCH O
HC
HCOH
CH_2OH

Unter dem Einfluß von Hydroxylionen kann aber diese β-Glucose unter Umständen in ein Isomeres übergehen, das wir als γ-Glucose bezeichnen wollen und dem nachstehend angegebene Form zugelegt werden kann:

γ-Glucose

HOCH
HCOH
HOCH
COH
HCOH
CH_2OH

Wie die Formeln zeigen, ist der γ-Oxydring der β-Form in einen Ring mit vier Kohlenstoffatomen übergegangen, was durch folgende Schreibweise noch klarer zutage tritt:



Carbozyklische Verbindungen mit vier Kohlenstoffatomen sind aber nach der *Baeyer*schen Spannungstheorie labilere Verbindungen als die Fünf- und Sechsringe, und es ist nicht unmöglich, daß sich aus dem Vierring unter Aufnahme von Wasser an den in der Abbildung bezeichneten Stellen 2 Mol. Glycerinaldehyd bilden. Dieser Aldehyd geht dann leicht, wie

Neuberg und *Rewald*[1]) gezeigt haben, über Methylglyoxal in Milchsäure über, was mit der Formel $C_6H_{12}O_6 = 2\,C_3O_3H_6$ übereinstimmt. Wir versuchten, die Zwischenstufe des Aldehyds abzufangen, allerdings bis jetzt mit negativem Erfolg. Dagegen erhält man, wie schon *Pinkus*[2]) gefunden, sehr leicht Methylglyoxal, wenn die Lösung mit Phenylhydrazin und Lauge gekocht wird. Mit ganz schwachen Alkalien und bei niederer Temperatur kann man *aus allen Zuckern*, wie *Neuberg* mit *Örtel*[3]) und *Rewald*[1]) gezeigt hat, Methylglyoxal gewinnen. Durch die Annahme dieser γ-Glucose gelingt es also, neben einer Erklärung für das Auftreten eines weiteren Methylglucosids auch ein in sich geschlossenes Schema für den Übergang einer Hexose in eine Triose zu geben. Des weiteren wird ersichtlich, daß auch Disaccharide infolge ihrer Aldehydgruppe ohne vorherige Inversion diesen Übergang zeigen können. Dieser vollzieht sich besonders leicht bei der Lactose, die merkwürdigerweise im Gegensatz zu ihrer großen Beständigkeit gegenüber Wasserstoffionen die größte Empfindlichkeit gegen Hydroxylionen zeigt.

Zusammenfassung.

1. Durch Einwirkung von Hydroxylionen auf die untersuchten Zucker (Lactose, Glucose und Galaktose) findet eine Erniedrigung der spezifischen Drehung statt, die bei steigender OH-Ionenkonzentration einem Werte zustrebt, der der Drehung der β-Modifikation der wasserfreien Zucker sehr nahe kommt. Man kann also diese Erniedrigung der Drehung durch Verschiebung des Gleichgewichtsgemenges zugunsten der niedrig drehenden Form deuten.

2. In der Tat ist es möglich, durch Verdünnung oder Neutralisation, am besten durch die sogenannte stufenweise Neutralisation, den Einfluß der OH-Ionen zu hemmen und damit eine langsame Drehungserhöhung, die bis nahe an den normalen Wert herangeht, zu bewirken.

3. Es besteht also zwischen der Wirkung der Wasserstoffionen und der Hydroxylionen ein inniger Zusammenhang mit der spezifischen Drehung des Zuckers. Verdünnte Säuren, also Wasserstoffionen, und sehr verdünnte Alkalien, also Hydroxylionen, bewirken nur ein rasches Abklingen der Mutarotation, das bei Alkalien augenblicklich erfolgen kann. In starker Säurelösung findet dann primär eine Erhöhung der spezifischen Drehung, bedingt durch Verschiebung des Gleichgewichtes zugunsten der α-Modifikation, statt. Diesem Vorgange entspricht im alkalischen Medium eine Erniedrigung der spezifischen Drehung, die durch Verschieben des Gleichgewichtes zugunsten der β-Form hervorgerufen wird. Sehr starke Säuren bewirken dann noch sekundäre Änderungen, indem durch chemische Einwirkung des Lösungsmittels bedingte Kondensations- oder Esterbildungen weitere Drehungserhöhungen hervorrufen. Das Gegenstück dazu bilden auf der anderen

[1]) *Neuberg* und *Rewald*, diese Zeitschr. **71**, 148, 1915.
[2]) *Pinkus*, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **31**, 31, 1898.
[3]) *Neuberg* und *Örtel*, diese Zeitschr. **55**, 495, 1913.

Seite die durch starke Hydroxylionenkonzentration hervorgerufenen Isomerisations- und Abbaureaktionen der Zucker.

4. Die Hydroxylionen wirken bereits in bedeutend geringerer Konzentration als die Wasserstoffionen.

5. Der Übergang der Hexosen oder auch der Disaccharide unter dem Einfluß von OH-Ionen in Verbindung mit niederem Kohlenstoffgehalt ist sicher ein Vorgang, der über verschiedene Zwischenstufen führen muß. Wir nehmen an, daß aus der β-Glucose unter Isomerisation sich primär die sogenannte γ-Glucose bildet, die an Stelle des γ-Oxydringes einen Kohlenstoffring, bestehend aus vier Kohlenstoffatomen, enthält, der wegen seiner geringen Beständigkeit unter Aufnahme von zwei Molekülen Wasser in Glycerinaldehyd zerfallen kann. Aus diesem Spaltprodukt bildet sich dann, wie von verschiedenen Autoren schon eingehend dargetan ist, über Methylglyoxal in größerer Menge Milchsäure. Bei den anderen Zuckern ist ein ähnlicher Abbau denkbar. Es ist nicht ausgeschlossen, daß der Abbau der Zucker in alkalischer Lösung demjenigen ähnlich ist, der unter bestimmten Bedingungen durch Enzyme veranlaßt wird. Für beide ist charakteristisch, daß sie ohne vorherige Inversion der Zucker möglich sind.

Die Einwirkung von Natriumsulfit auf die Kohlenhydrate, insbesondere auf die Glucose.

Auf diesem Gebiete sind polarimetrische Arbeiten im größeren Maßstabe unseres Wissens noch nicht ausgeführt worden. Dagegen haben gärungschemische Arbeiten eine gleich große wissenschaftliche wie technische Bedeutung erlangt. *Neuberg*[1]) und seiner Schule ist es gelungen, die gewöhnliche alkoholische Gärung durch Zugabe von sekundären schwefligsauren Salzen so zu leiten, daß Glycerin und Acetaldehyd – letzterer in Form des Sulfitkomplexes — in molekularem Verhältnis auftreten, und *Connstein* und *Lüddecke*[2]) haben während des Krieges auf demselben Wege Glycerin in industriellem Ausmaß herzustellen vermocht.

Wir sind zur Bearbeitung dieses Gebietes übergegangen, weil wir auf Grund unserer im vorigen Abschnitt entwickelten Theorie versuchten, mit Natriumsulfit eines der möglichen Zwischenprodukte beim alkalischen Abbau der Zucker isolieren zu können. Wir wählten zu diesen Versuchen Natriumsulfit, weil dieses neben der alkalischen Wirkung auch intermediär auftretende Aldehyde zu binden — „abzufangen" – vermag. Für alle Versuche, die sich nur auf die Glucose beschränken, wurde eine Lösung von 30 g entwässerten Natriumsulfits in 100 ccm Wasser verwendet. Bei gewöhnlicher Temperatur wirkt diese Lösung

[1]) *Neuberg* und *Färber*, diese Zeitschr. **78**, 238, 1916; *Neuberg* und *Reinfurth*, ebendaselbst **89**, 365, 1918; **92**, 234, 1918.

[2]) *Connstein* und *Lüddecke*, Ber. **52**, 1385, 1919.

infolge der geringen Hydroxylionenkonzentration innerhalb 12 Stunden nicht merklich auf die Glucose ein. Erhitzt man aber diese Lösung einige Zeit zum Sieden, so färbt sie sich rasch rot, indem die Drehung langsam bis 0° oder sogar bis — 1,0° abfällt. Säuert man diese gefärbte Lösung durch Zugabe einiger Tropfen Eisessig oder konzentrierter Salzsäure schwach an, so wird sie wieder hell. Dabei findet aber eine langsame Zunahme der Drehung im negativen Gebiete je nach der Zuckerkonzentration bis — 3,0 oder bis — 5,0° statt. Die Rechtsdrehung der Lösung geht also über Null in eine Linksdrehung über. Der Grund zu diesen nachträglichen Drehungsänderungen beim Ansäuern ist von vornherein nicht klar zu übersehen. Bevor wir uns der Beantwortung dieser Frage zuwenden, wollen wir erst die experimentellen Daten zusammenstellen.

Das bei den Versuchen verwendete Natriumsulfit wurde immer frisch durch Entwässern von kristallisiertem Natriumsulfit bei 120° hergestellt. Als vorteilhaft haben sich folgende Versuchsbedingungen erwiesen: 30 g Glucose und 30 g entwässertes Natriumsulfit werden in 100 ccm Wasser gelöst und gegebenenfalls durch Filtration durch Asbest geklärt, um polarisationsfähige Lösungen zu erhalten. Im 1-dm-Rohr zeigt die Lösung bei Zimmertemperatur eine Drehung von etwa 9,5°. Dieser Wert ändert sich während einiger Stunden nur geringfügig. Erhitzt man dann die Lösung am Rückflußkühler zum Sieden, so nimmt die Drehung unter Verfärbung rasch ab. Nach 20 Minuten wird der Prozeß durch Abkühlung unterbrochen. Die Lösung ist infolge starker Rotfärbung schwer polarisierbar. Die Drehung ist 0° oder auch schwach links. Wie schon eingangs erwähnt, klärt sich die Lösung nach Zugabe von 1 ccm konzentrierter Salzsäure oder konzentrierter Essigsäure und zeigt dann eine langsame Drehungszunahme im negativen Gebiete bis zu — 5,0°. Zur Erklärung dieses Phänomens nahmen wir zuerst an, daß der durch die Zersetzung sich bildende Glycerinaldehyd unter dem Einfluß des aus Natriumsulfit und Säure entstehenden Natriumbisulfits langsam in die Bisulfitverbindung übergeht. Wir sind von dieser Ansicht einstweilen abgekommen, weil wir noch keine einwandfreien experimentellen Beweise dafür erbringen können. Man muß aber aus der starken Verfärbung der Lösung unbedingt schließen, daß Spaltprodukte der Glucose auftreten. Es hat sich weiter noch ergeben, daß längeres Kochen die nachfolgende Linksdrehung verringert. Das alles läßt darauf schließen, daß hierbei verschiedene Reaktionen neben- und nacheinander sich abspielen. Stellt man z. B. nach der Vorschrift von *Emil Fischer* die Osazonprobe an, so erhält man ein Gemisch der verschiedensten Osazone. Aus der starken beobachteten Linksdrehung ist zu schließen, daß eine Verbindung mit diesem Drehungssinn in größerer und daher auch abscheidbarer Menge entsteht. Von allen hier möglichen Zuckern

kommt aber nur der Fructose Linksdrehung zu. Schon *Neuberg* und Mitarbeiter[1]) haben festgestellt, daß die Drehung einer Lösung von Glucose in Dinatriumsulfit nahezu auf 0 absinkt und die Flüssigkeit die Reaktionen der Lävulose aufweist. Ihre Bildung kann man sich wie folgt erklären: Die Natriumsulfitlösung reagiert infolge hydrolytischer Spaltung alkalisch. Wie *Lobry de Bruyn* und *van Eckenstein* (l. c.) bereits fanden, bewirken OH-Ionen bei gewisser Konzentration, vor allem bei höherer Temperatur, isomere Umlagerungen, d. h. es stellt sich in der Lösung ein Gleichgewicht verschiedener sterisch verwandter Zucker ein. Aus der Glucose bildet sich langsam ein Gleichgewichtszustand zwischen Fructose, Glucose und Mannose aus. Der Drehungswert dieses Gleichgewichtsgemenges dieser drei Zucker ist von Null sehr wenig verschieden. Es lag nun nahe, anzunehmen, daß bei der oben erwähnten Reaktion sich primär in der Hauptsache ein ähnlicher Gleichgewichtszustand herausbildet und daß sich die weiteren Änderungen als Verschiebungen dieses Gleichgewichtes deuten lassen. So wird z. B. dasjenige Kohlenhydrat, das die geringste Widerstandsfähigkeit gegen Alkalien besitzt, durch langanhaltendes Kochen langsam unter Zersetzung aus dem Gleichgewicht entfernt und so dauernd eine Verschiebung nach dieser Seite bewirkt, bis eben aller Zucker zersetzt ist. Ob dabei der Glycerinaldehyd als Zwischenprodukt auftritt, wird sich schwer feststellen lassen, da wahrscheinlich unter den gegebenen Bedingungen sehr rasch eine Umlagerung in Methylglyoxal stattfinden wird. In der Tat wird ja auch bei längerer Kochdauer die nachfolgende Linksdrehung der Lösung immer geringer, was einwandfrei auf Zersetzung schließen läßt. Wird der Versuch, wie in obiger Vorschrift angegeben, schon nach 20 Minuten Kochdauer unterbrochen, so gelingt es, ein anderes Umwandlungsprodukt der Glucose, nämlich die Fructose, zu fassen, da es gelingt, die Drehung des Gleichgewichtsgemenges so zu verändern, daß die Drehung der Fructose mehr zur Geltung kommt. Es ist auch nicht schwer, sich von den inneren Zusammenhängen, die zu diesem Resultat führen, ein anschauliches Bild zu machen. Wird die durch Erhitzen rot gefärbte und nahezu optisch inaktiv gewordene Lösung tropfenweise mit konzentrierter Essigsäure oder Salzsäure versetzt, so wird im ersten Augenblick schweflige Säure frei, die aber sofort mit überschüssigem Natriumsulfit unter Bildung von Natriumbisulfit reagiert. Dieses wird sich entsprechend seiner Konzentration an die in der Lösung vorhandenen Aldosen, insbesondere an die Glucose und Mannose anlagern und mit diesen Natriumsalze der aldehydschwefligen Säuren bilden. Damit ist aber unbedingt eine Änderung der Gesamtdrehung des Gleichgewichtsgemenges zu erwarten. Wie im letzten Abschnitt zu diesem Zwecke gezeigt wird, besitzen

[1]) *Neuberg*, *Reinfurth* und *Hirsch*, diese Zeitschr. **105**, 326, 1920.

diese aldehydschwefligen Säuren, die ebenfalls in verschiedenen stereoisomeren Formen existieren können, Gleichgewichtsdrehungen, die von Null sehr wenig verschieden sind. Je nach dem Verhältnis $\frac{\text{Glucose}}{NaHSO_3}$ wird der Strahl des polarisierten Lichtes mehr oder weniger weit, im Durchschnitt im 1-dm-Rohr bis 1,0° nach rechts abgelenkt. Die Fructose bildet, wie durch besondere Versuche gezeigt wurde, unter diesen Konzentrationsbedingungen kein Anlagerungsprodukt. Sie wird also, nachdem die anderen Gleichgewichtskomponenten durch Natriumbisulfit und durch nachfolgende Umwandlung der entstehenden stereoisomeren Formen ineinander sozusagen optisch neutralisiert sind, durch ihre charakteristische Linksdrehung die Gesamtdrehung des Gleichgewichtes bestimmen. Entsprechend dem Fortgange der Bildung der aldehydschwefligen Säuren wird die Drehung der Lösung ins negative Gebiet hereinwandern. Der Versuch bestätigt diese Annahme vollkommen. Diese Ansicht gewinnt noch durch einige eindeutige Versuche bedeutend an Wahrscheinlichkeit.

Wenn nur die primäre Bildung von Natriumbisulfit, die eine Bildung von aldehydschwefligen Säuren zur Folge hat, der ausschlaggebende Faktor ist, dann muß es auch gelingen, lediglich durch Einleiten von Schwefeldioxyd in die erhaltene alkalische, rot gefärbte Natriumsulfit-Glucoselösung dieselben Effekte zu bekommen. Zu diesem Zwecke haben wir zwei Versuchsserien durchgeführt:

1. 10 ccm der nach der eingangs angegebenen Vorschrift erhaltenen Lösung werden im Polarimeterrohr bei Zimmertemperatur tropfenweise mit konzentrierter Essigsäure (ungefähr 1 ccm) versetzt; die Lösung klärt sich zusehends und zeigt eine Drehung von ungefähr 0°. Innerhalb einer Stunde wächst aber die Drehung im negativen Gebiet bis zu einem Wert von ungefähr — 3 bis — 4°.

2. In 10 ccm derselben Lösung wird Schwefeldioxyd im langsamen Strom eingeleitet, die Lösung klärt sich ebenfalls entsprechend dem Fortgang der Bisulfitbildung: nach 45 Minuten zeigt sie im 1-dm-Rohr dieselbe Linksdrehung wie die nach der ersten Methode erhaltene Lösung. Aus diesen beiden Versuchen geht einwandfrei hervor, daß das Auftreten von Natriumbisulfit, verbunden mit einer Bildung von aldehydschwefligen Säuren der Grund für die nachträglichen Drehungsänderungen der Lösung ist.

Zum Schluß haben wir noch durch Darstellung des für die Fructose höchst charakteristischen Methylphenylosazons nach der Vorschrift von *Neuberg* dieselbe in dem endgültigen Gemisch identifiziert.

50 ccm der erhaltenen Lösung werden mit Essigsäure schwach angesäuert, durch längeres *Absaugen* das Schwefeldioxyd entfernt, dann mit 5 g Methylphenylhydrazin und so viel Alkohol, als zur Lösung notwendig ist, versetzt und 5 Minuten auf einem kochenden Wasserbade erwärmt. Der sich nach einiger Zeit ausscheidende rötliche Niederschlag wurde zur Reinigung öfter aus Alkohol umkristallisiert. Die erhaltenen gelbroten Nadeln zeigten einen Schmelzpunkt von 158°, der mit dem des Methylphenylosazons der Fructose übereinstimmt. Auf eine nähere Analyse der Verbindung wurde verzichtet.

Zusammenfassung.

1. Durch die Einwirkung von Natriumsulfit in geeigneter Konzentration bei höherer Temperatur auf Glucose ist es hier also zum erstenmal gelungen, den von *Lobry de Bruyn* und *van Eckenstein* auf Grund der Analyse aufgestellten Übergang der Glucose in Fructose und Mannose so zu leiten, daß dabei die Fructose mit ihrer charakteristischen Linksdrehung direkt im Polarimeterrohr nachgewiesen werden kann.

2. Bei der Ausführung der Versuche darf eine bestimmte Kochdauer nicht überschritten werden, weil sonst die entstehende Fructose unter der Einwirkung der OH-Ionen der Lösung weiter zu Produkten mit niederem Kohlenstoffgehalt abgebaut wird, was aus der starken Verfärbung der Lösung geschlossen werden muß.

3. Die im Gleichgewicht mit anderen Hexosen und sicher auch mit Triosen befindliche Fructose erteilt der Lösung die für sie charakteristische Drehung, weil das durch das Ansäuern entstehende Natriumbisulfit sofort mit den Aldehyden unter Bildung von aldehydschwefligen Säuren reagiert, die, wie im letzten Abschnitt gezeigt wird, infolge gegenseitigen Überganges verschiedener stereoisomerer Formen ineinander unbedeutende schwache Rechtsdrehung besitzen. Die Fructose bildet unter diesen Bedingungen kein solches Anlagerungsprodukt.

4. Eine Klärung der Lösung und somit auch ein Übergang der Drehung ins negative Gebiet läßt sich bewirken, indem man anstatt der Neutralisation mit Essigsäure in die Lösung einen langsamen Strom von Schwefeldioxyd einleitet. Damit ist einwandfrei bewiesen, daß die primäre Bildung von Natriumbisulfit der Grund zu diesen Drehungsänderungen ist.

5. Die Fructose (als Umwandlungsprodukt) konnte als Methylphenylosazon identifiziert werden.

Die Einwirkung von Natriumbisulfit auf die Kohlenhydrate.

Über dieses Gebiet konnten wir außer den Arbeiten *Kerps*[1]), die hauptsächlich vom nahrungsmittelchemischen Gesichtspunkt aus unternommen wurden und zur Darstellung der glucoseschwefligen Säure geführt haben, in der Literatur keine weiteren Arbeiten finden. Für uns war es, wie im vorhergehenden Abschnitt auseinandergesetzt wurde, wichtig zu wissen, welche Drehungsänderungen die Glucose, Fructose und Mannose unter dem Einfluß von Natriumbisulfit erleiden. Später haben wir auch noch die anderen Kohlenhydrate untersucht. Diese Versuche bringen nun wichtige experimentelle Beweise für unsere

---

[1]) *Kerp*, Arb. a. d. Kaiserl. Gesundheitsamt **21**, 180, 372; **26**, 231, 269.

im zweiten Abschnitt aufgestellten Theorien der Mutarotation. Nach dem dort angeführten Schema

$$\text{Aldehydform} \rightleftarrows \alpha\text{-Form } (\beta\text{-Form}) \rightleftarrows \beta\text{-Form } (\alpha\text{-Form})$$

müssen die Kohlenhydrate auch schon in neutraler Lösung schwache Aldehydeigenschaften zeigen, während bis jetzt nur in alkalischer Lösung diese Reaktionen studiert wurden. Man war daher auch geneigt anzunehmen, daß erst unter dem Einfluß von OH-Ionen Aufspaltung des Ringes unter Bildung der Aldehydform erfolgt und stellte daher folgendes Schema für die Mutarotation auf:

$$\alpha\text{-Form} \rightleftarrows \text{Hydrat} \rightleftarrows \beta\text{-Form.}$$

Wir haben im Abschnitt II eingehend ausgeführt, warum wir von diesem Schema abgekommen sind.

Auf Grund unserer Ansicht über die Mutarotation muß es also nicht nur möglich sein, das Gleichgewicht zwischen den beiden stereoisomeren Formen zugunsten der einen oder anderen Modifikation zu verschieben, wie es sehr leicht durch Wasserstoff- und Hydroxylionen geschieht, sondern es müssen auch durch Einwirkung von Natriumbisulfit Veränderungen zugunsten der Aldehydform möglich sein. Wenn dabei die Bindung der Aldehydstufe recht rasch stattfindet, so kann es vorkommen, daß auch in wässeriger Lösung eine schnelle Abnahme der Mutarotation eintritt. Die folgenden Versuche werden diese Annahmen vollkommen bestätigen.

Die verwendeten Natriumbisulfitlösungen wurden immer frisch hergestellt und nötigenfalls durch Asbestfiltration vor Zusatz der Zucker geklärt.

1. *Einwirkung von Natriumbisulfit auf Glucose*[1]).

1 g Glucose und 1 g Natriumbisulfit (rein) werden in 10 ccm Wasser gelöst. Die Lösung reagiert gegen Phenolphthalein negativ und gegen Lackmus sehr schwach alkalisch. Rohrlänge 1 dm. Versuchstemperatur 18 bis 20°.

Zeit Minuten	Winkel Grad	Spez. Drehung Grad	Zeit Minuten	Winkel Grad	Spez. Drehung Grad
2	5,70	57,0	30	2,90	29,0
5	3,10	51,0	60	2,50	25,0
10	4,35	43,5	180	2,50	25,0
20	3,50	35,0	∞	2,50	25,0

1 g Glucose und 2 g Natriumbisulfit werden in 10 ccm Wasser gelöst. Rohrlänge 1 dm. Versuchstemperatur 18 bis 20°.

Zeit Minuten	Winkel Grad	Spez. Drehung Grad	Zeit Minuten	Winkel Grad	Spez. Drehung Grad
1	5,30	53,0	20	1,50	15,0
2	4,80	48,0	30	1,00	10,0
5	3,50	35,0	60	0,95	9,5
10	2,40	24,0	∞	0,90	9,0

[1]) Siehe Abb. 2 und 3 der graphischen Darstellungen.

1 g Glucose und 3 g Natriumbisulfit werden in 10 ccm Wasser gelöst. Röhrlänge 1 dm. Versuchstemperatur 18 bis 20°.

Zeit Minuten	Winkel Grad	Spez. Drehung Grad	Zeit Minuten	Winkel Grad	Spez. Drehung Grad
2	4,20	42,0	45	0,40	4,00
5	3,10	31,0	60	0,30	3,00
10	1,95	19,5	∞	0,30	3,00
20	1,00	10,0			

Wie man aus vorstehenden Tabellen und noch besser aus der graphischen Darstellung ersieht, ist schon innerhalb der ersten Minuten nach dem Auflösen die Mutarotation fast vollkommen

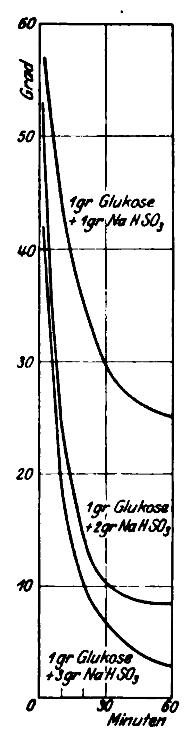


Abb. 2 u. 3. Abhängigkeit der Glucosedrehung von der Bisulfitkonzentration.

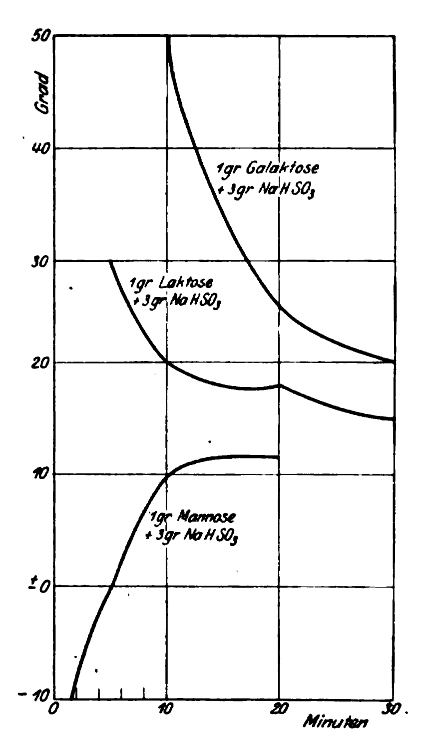


Abb. 4. Die Drehung von Galaktose, Lactose und Mannose bei Einwirkung von Natriumbisulfit.

abgeklungen. Die Lösung zeigt aber noch keine konstante Drehung, sondern diese nimmt je nach dem Natriumbisulfitgehalt der Lösung bis zu einem konstanten Endwert ab. Die Enddrehung ist ebenfalls eine Funktion der Bisulfitkonzentration und um so niedriger, je höher dieselbe ist. Wir denken uns den Vorgang folgendermaßen:

Aus der Aldehydform der Glucose und Natriumbisulfit bildet sich unter Wiederaufrichtung des fünften asymmetrischen Kohlenstoffatoms die glucoseschweflige Säure, von der aber, wie von der Glucose selbst, zwei stereoisomere Formen existieren können, die dann ähnlich wie bei der Mutarotation ineinander übergehen. Die Drehung dieses Gleichgewichtsgemenges liegt, wie auch schon *Kerp* beobachtet hatte, sehr nahe bei Null. Nach dieser Methode ist es möglich, auf bequemere Weise, wie *Kerp* angibt, die glucoseschweflige Säure zu erhalten. Die Isolierung derselben geschah nach den Vorschriften *Kerps*. Wir haben ebenfalls filzige Nadeln erhalten, die nicht weiter untersucht worden sind.

Wie aus Versuch 3 der vorstehenden Versuchsserie folgt, läßt sich auf diese Weise die Glucosedrehung in einem Gleichgewicht fast vollständig ausschalten, weil bei dieser Sulfitkonzentration die spezifische Drehung der entstehenden glucoseschwefligen Säure nur 3,0° beträgt. Von dieser Tatsache haben wir im vorhergehenden Abschnitt Gebrauch gemacht.

2. *Einwirkung von Natriumbisulfit auf die Galaktose*[1].

1 g Galaktose und 3 g Natriumbisulfit werden in 10 ccm Wasser gelöst. Rohrlänge 1 dm. Temperatur 18°.

Zeit Minuten	Winkel Grad	Spez. Drehung Grad
10	5,00	50,0
20	2,60	26,0
30	2,00	20,0
∞	1,00	10,0

3. *Einwirkung von Natriumbisulfit auf die Lactose*[1].

1 g Lactose und 3 g Natriumbisulfit werden in 10 ccm Wasser gelöst. Rohrlänge 1 dm. Versuchstemperatur 18°.

Zeit Minuten	Winkel Grad	Spez. Drehung Grad	Zeit Minuten	Winkel Grad	Spez. Drehung Grad
5	3,00	30,0	30	1,50	15,0
10	2,00	20,0	∞	1,30	13,0
20	1,80	18,0			

Wie vorstehende Tabellen und die Abbildung zeigen, gilt das bei der Glucose Gesagte auch für die Galaktose und Lactose.

4. *Die Einwirkung von Natriumbisulfit auf Fructose.*

1 g Fructose und 3 g Natriumbisulfit werden in 10 ccm Wasser gelöst. Rohrlänge 1 dm. Versuchstemperatur 18°.

[1]) Siehe Abb. 4 der graphischen Darstellungen.

Zeit Minuten	Winkel Grad	Spez. Drehung Grad	Zeit Minuten	Winkel Grad	Spez. Drehung Grad
1,5	— 11,00	110,0	30	— 9,80	98,0
2	— 10,50	105,0	60	— 9,80	98,0
5	— 10,00	100,0	∞	— 9,80	98,0
15	— 9,80	98,0			

Die Fructose zeigte in dieser Lösung die gewöhnliche Mutarotation. Der Einfluß von Natriumbisulfit auf die Carbonylgruppe ist also, wie zu erwarten war, geringer als auf die Aldehydgruppe. Die Fructosedrehung wird nur unwesentlich beeinflußt und tritt dann, wie im vorhergehenden Abschnitt gezeigt wurde, bei Ausschaltung der Glucosedrehung durch Natriumbisulfit in Erscheinung. Vielleicht ist es möglich, auf diesem Wege eine bequeme polarimetrische Trennungsmethode dieser beiden Kohlenhydrate auszuarbeiten. Wenn ein festes Gemisch dieser beiden Zucker vorliegt, ist die Methode bei Berücksichtigung der geringen Glucosedrehung ohne weiteres brauchbar.

5. Die Einwirkung von Natriumbisulfit auf Saccharose.

1 g Saccharose und 3 g Natriumbisulfit werden in 10 ccm Wasser gelöst. Rohrlänge 1 dm. Versuchstemperatur 18⁰.

Zeit Minuten	Winkel Grad	Spez. Drehung Grad	Zeit Minuten	Winkel Grad	Spez. Drehung Grad
1,5	5,20	52,0	40	5,20	52,0
2	5,20	52,0	∞	5,20	52,0
5	5,20	52,0			

Wie zu erwarten war, wird die Drehung von Saccharose durch Zugabe von Natriumbisulfit nicht geändert, weil keine Aldehyd- und Ketogruppen in dieser Verbindung vorhanden sind.

6. Die Einwirkung von Natriumbisulfit auf Maltose.

1 g Maltose und 3 g Natriumbisulfit werden in 10 ccm Wasser gelöst. Rohrlänge 1 dm. Versuchstemperatur 18⁰.

Zeit Minuten	Winkel Grad	Spez. Drehung Grad	Zeit Minuten	Winkel Grad	Spez. Drehung Grad
1,5	10,00	100,0	25	9,80	98,0
3	10,00	100,0	∞	9,50	95,0
5	9,80	98,0			

Wie bei der Einwirkung starker Säuren, so macht auch hier die Maltose eine bemerkenswerte Ausnahme. Während bei den übrigen Aldosen nennenswerte Drehungsänderungen stattfinden, zeigt die Maltose sofort nach dem Auflösen eine fast konstante Drehung, die sich nur innerhalb längerer Zeit um $0{,}5^0$ vermindert. Es ist schwer, sich ein einwandfreies Bild von diesem Verhalten der Maltose zu machen. Sicher wird auch hier die Aldehydform durch Bindung gleich nach

dem Auflösen festgelegt. Da dann aber keine weiteren nennenswerten Drehungsänderungen mehr erfolgen, scheint nur ein sehr geringer Übergang der beiden stereoisomeren Formen der aldehydschwefligen Säuren ineinander stattzufinden, der vielleicht durch einen Übergang der niedrig drehenden Form in die höher drehende Form teilweise ausgeglichen wird.

Zum Schluß wurde auch die Mannose unter ähnlichen Bedingungen untersucht.

7. *Die Einwirkung von Natriumbisulfit auf Mannose*[1]).

1 g Mannose und 3 g Natriumbisulfit werden in 10 ccm Wasser gelöst. Rohrlänge 1 dm. Versuchstemperatur 18°.

Zeit Minuten	Winkel Grad	Spez. Drehung Grad	Zeit Minuten	Winkel Grad	Spez. Drehung Grad
1,5	− 1,00	− 10,0	10	+ 1,00	+ 10,0
3	− 0,50	− 5,0	20	+ 1,16	+ 11,6
5	± 0,00	± 0,0	∞	+ 1,33	+ 13,3

Das Verhalten der Mannose in Natriumbisulfitlösung gleicht dem in wässeriger Lösung vollkommen. Auch hier verwandelt sich die Linksdrehung der Lösung langsam in eine Rechtsdrehung. Besonders auffallend ist, daß der Endwert der Drehung (13,3°) der gewöhnlichen spezifischen Drehung der Mannose sehr nahe kommt. Die Mannose wird wahrscheinlich, da sie von allen Zuckern die ausgeprägtesten Aldehydeigenschaften besitzt, schon innerhalb der kurzen Zeit des Auflösens mit Natriumbisulfit unter Bildung der aldehydschwefligen Säuren reagieren. Der Übergang der beiden stereoisomeren Formen erfolgt dann ziemlich langsam.

Zusammenfassung.

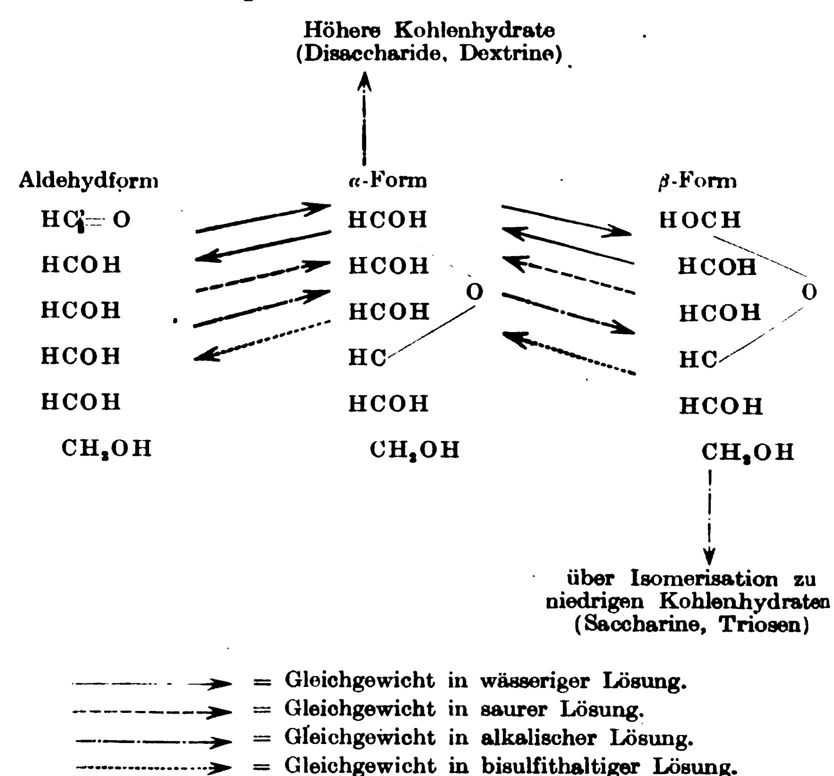
1. Aus allen diesen Versuchen folgt, daß es möglich ist, die Drehung des Gleichgewichtsgemenges der stereoisomeren Formen, die in saurer Lösung vorwiegend zugunsten der höher drehenden, in alkalischer Lösung zugunsten der niedrig drehenden Modifikation verschoben wird, auch in neutraler Lösung durch Natriumbisulfit zugunsten der Aldehydform zu verschieben.

2. Man ist daher unbedingt gezwungen anzunehmen, daß auch in wässeriger Lösung die Aldehydform bereits vorgebildet ist und nicht erst unter Aufspaltung des γ-Oxydringes gebildet wird. Die Annahme, daß das nach der Mutarotation sich einstellende Gleichgewicht mindestens aus drei Formen (der α-, β- und Aldehydform) zusammengesetzt ist, tritt dadurch aus dem Stadium der Hypothese.

[1]) Siehe Abb. 4 der beiliegenden graphischen Darstellungen.

3. Nicht nur durch Einwirkung von Wasserstoff- oder Hydroxylionen, sondern auch durch Natriumbisulfit unter Bildung von aldehydschwefligen Säuren ist ein sehr rasches Zerstören der Mutarotation möglich.

4. Die Einstellung des Gleichgewichtes in verschiedenen Lösungen wird durch nachfolgendes Schema veranschaulicht:



= Gleichgewicht in wässeriger Lösung.
= Gleichgewicht in saurer Lösung.
= Gleichgewicht in alkalischer Lösung.
= Gleichgewicht in bisulfithaltiger Lösung.

Zur Frage nach dem Einfluß der Arsen- und Antimonverbindungen auf die fermentative Funktion des Organismus.

I. Mitteilung.

Der Einfluß einiger Arsen- und Antimonpräparate auf die Speichelamylase[1].

Von

J. A. Smorodinzew und **Fr. E. A. Iliin.**

(Aus dem Laboratorium für biologische Chemie der II. Moskauer Staats-Universität.)

(Eingegangen am 14. Juli 1923.)

Die Antimon- und besonders die Arsenverbindungen spielen schon seit langem eine hervorragende Rolle unter den Arzneimitteln und erfreuen sich, namentlich in den letzten Jahren, der besonderen Aufmerksamkeit einiger Forscher, welche sie vom Standpunkte der spezifischen Chemotherapie studieren. Da die Lebensprozesse im Organismus aus der kombinierten Tätigkeit einer ganzen Reihe von Fermenten entstehen, so bietet zum besseren Verständnis des Mechanismus oder, besser gesagt, des Chemismus der Wirkung der erwähnten Präparate eine genaue Bekanntschaft mit dem Charakter ihres Einflusses auf die einzelnen fermentativen Funktionen des Organismus ein hervorragendes Interesse dar.

In dieser Beziehung ist vorliegende Frage noch sehr wenig erforscht.

Es ist uns nur gelungen, eine Abhandlung zu finden, in welcher unter anderem von der Wirkung einiger Arsen- und Antimonverbindungen auf das Ptyalin die Rede ist. Indem *Chittenden* und *Peinter*[2]) das Reduktionsvermögen der Zerfallsprodukte der Stärke unter der

[1]) Mitgeteilt in einer Konferenz im Tropeninstitut des Gesundheitskommissariats am 15. Februar 1923.

[2]) *Chittenden* and *Peinter*, Transact. of Con. Acad. 7, 60, 1878.

Einwirkung der Speichelamylase bei Gegenwart von Arsen- und Antimonverbindungen bestimmten, konstatierten sie, daß As_2O_3 bei einem Gehalt von 0,003 Proz. im Medium den Saccharafizierungsprozeß beschleunigt, ebenso würden 0,00015 bis 0,015proz. H_3AsO_4-Lösungen wirken, doch gebe sich schon bei 0,025proz. eine hemmende Wirkung kund. Brechweinstein fördere ihrer Ansicht nach die Verdauung der Stärke bei 0,015 Proz. und beginne bei 0,1 Proz. schädlich zu wirken.

Es ist heutzutage sehr schwer, sich die gewünschten Präparate zu verschaffen, außerdem gibt das Antimon überhaupt sehr wenige wasserlösliche Verbindungen, die zum Studium in der erwähnten Beziehung taugten. Aus diesem Grunde mußten wir uns vorderhand mit einem Doppelsalz aus Kaliumtartrat und Antimonoxyd oder mit Brechweinstein, welche therapeutisch verwandt werden, und mit Antimontrichlorid begnügen. In Anbetracht dessen, daß das letztgenannte Präparat nur in Salzsäure und Weinsäure löslich ist, waren wir genötigt, parallele Versuche mit beiden genannten Säuren anzustellen, um, so weit möglich, auch ihren Einfluß im Gemenge in Betracht ziehen zu können. Das Arsen benutzten wir in Gestalt von Natriumarseniat und Kalium- und Natriumarseniten, die häufig zu medizinischen Zwecken verwandt werden. Wir bestrebten uns, Antworten auf zwei Fragen zu erhalten: 1. auf welche Weise die genannten Präparate den Prozeß der Verdauung der Stärke durch die Speichelamylase beeinflussen, und 2. in was für Konzentrationsgraden sie imstande sind, den ihnen eigentümlichen Einfluß kundzugeben.

Um diesen Zweck zu erreichen, glaubten wir am geeignetsten uns der *Roberts*schen[1]), von *Wohlgemuth*[2]) weiter ausgearbeiteten Methode zu bedienen und betrachteten als Kriterium die Erreichung des „achromatischen Punktes"[3]) in einer 0,1proz. Lösung der löslichen Stärke *Kahlbaum* im Laufe von 30 Minuten bei 38°. Der Speichel wurde in einer Reihe von Probierröhrchen dermaßen verteilt, daß ein jedes nachfolgende zweimal weniger als das vorhergehende enthielt. Die dabei erhaltenen Resultate sind in Tabellen (I bis VIII) dargestellt, in denen typische Fälle aus einer Reihe von analogen Beobachtungen angeführt sind. Im allgemeinen bestätigten und vervollständigen die Daten unserer Versuche *Chittendens* und *Peinters* Beobachtungen. Da diese Verfasser freie Säuren, wir aber Salze derselben Säuren benutzten, so darf angenommen werden, daß der hemmende Einfluß in diesem Falle gerade dem Arsen, nicht aber den $H^{\cdot}$-Ionen oder den Ionen der Alkalimetalle zuzuschreiben ist. Dagegen muß die beschleunigende Wirkung minimaler Dosen von Arsen und arseniger Säure in *Chittendens* und *Peinters* Versuchen, welche von uns nicht beobachtet wurden, den

---

1) *W. Roberts*, Proc. Royal. Soc. **32**, 145, 1881.

2) *J. Wohlgemuth*, diese Zeitschr. **9**, 1, 1908.

3) *J. A. Smorodinzew*, Die Fermente des Pflanzen- und Tierreichs **2**, 156, 1920 (russisch).

Tabelle I. Doppelsalz aus Kaliumtartrat u. Antimonoxyd. Antimontrichlorid.

Nr.	Reagens	Konzentration des Reagens	Konzentration des Ferments	N_2 des letzten farblosen Probierröhrchens[1]	Quantität der Fermenteinheiten
1	$C_4H_4O_6<^{K}_{SbO}$	0,018 N	Speichel 1 : 25	3	8
2	$C_4H_4O_6<^{K}_{SbO}$	0,018 N	„ 1 : 25	3	8
3	H_2O	—	„ 1 : 25	5	32
4	$SbCl_3$	0,2 N	„ 1 : 25	Alle sind	—
5	$SbCl_3$	0,2 N	„ 1 : 25	gefärbt	—
6	$SbCl_3$	0,02 N	„ 1 : 25	1	2
7	$SbCl_3$	0,02 N	„ 1 : 25	1	2
8	H_2O	—	„ 1 : 25	5	32

[1]) Bei der Feststellung des „achromatischen Punktes" muß in Betracht gezogen werden, daß das Doppelsalz Kalium und Antimontartrat Jod bindet und in entsprechend größerer Menge zugesetzt werden muß.

Tabelle II. Doppelsalz aus Kaliumtartrat u. Antimonoxyd. Antimontrichlorid.

Nr.	Reagens	Konzentration des Reagens	Konzentration des Ferments	N_2 des letzten gefärbten Probierröhrchens	Hemmende Konzentration	
					Molekular	Proz. im Gemenge
9	$C_4H_4O_6<^{K}_{SbO}$	0,18 N	Speichel 1:400 1:400	9	0,0007	0,003
10	$C_4H_4O_6<^{K}_{SbO}$	0,18 N	„ 1:400 1:400	9	0,0007	0,003
11	$C_4H_4O_6<^{K}_{SbO}$	0,06 N	„ 1:400 1:400	7	0,0009	0,004
12	$C_4H_4O_6<^{K}_{SbO}$	0,06 N	„ 1:400 1:400	7	0,0009	0,004
13	$C_4H_4O_6<^{K}_{SbO}$	0,018 N	„ 1:400 1:400	6	0,0006	0,002
14	$C_4H_4O_3<^{K}_{SbO}$	0,018 N	„ 1:400	6	0,0006	0,002
15	$SbCl_3$	0,01 N	„ 1:400	9	0,00004	0,00008
16	$SbCl_3$	0,01 N	„ 1:400	9	0,00004	0,00008
17	$SbCl_3$	0,005 N	„ 1:400	8	0,00004	0,00008

Tabelle III. Antimontrichlorid. Salzsäure.

Nr.	Reagens	Konzentration des Reagens	Konzentration des Ferments	N_2 des ersten farblosen Probierröhrchens	Hemmende Konzentration	
					Molekular	Proz. im Gemenge
18	$SbCl_3$	0,001 N	Speichel 1:800	7	0,00002	0,00004
19	$SbCl_3$	0,001 N	„ 1:800	7	0,00002	0,00004
20	$SbCl_3$	0,001 N	„ 1:800	7	0,00002	0,00004
21	$SbCl_3$	0,001 N	„ 1:800	7	0,00002	0,00004
22	HCl	0,027 N	„ 1:800	7	0,0004	0,0004
23	HCl	0,027 N	„ 1:800	7	0,0004	0,0004
24	HCl	0,027 N	„ 1:800	7	0,0004	0,0004

Tabelle IV.

Salzsäure. Weinsäure.

Nr.	Reagens	Konzentration des Reagens	Konzentration des Ferments	N_2 des letzten farblosen Probierröhrchens	Quantität der Fermenteinheiten
25	HCl	2 N	Speichel 1:25	Alle sind gefärbt	—
26	HCl	2 N	„ 1:25	„ „ „	—
27	H_2O	—	„ 1:25	5	32
28	$C_4H_6O_6$	0,1 N	„ 1:25	Alle sind gefärbt	—
29	$C_4H_6O_6$	0,1 N	„ 1:25	„ „ „	—
30	H_2O	—	„ 1:25	5	32

Tabelle V.

Salzsäure. Weinsäure.

Nr.	Reagens	Konzentration des Reagens	Konzentration des Ferments	N_2 des letzten gefärbten Probierröhrchens	Hemmende Konzentration	
					Molekular	Proz. im Gemenge
31	HCl	0,15 N	Speichel 1:400	7	0,002	0,002
32	HCl	0,15 N	„ 1:400	7	0,002	0,002
33	HCl	0,27 N	„ 1:400	8	0,002	0,002
34	HCl	0,27 N	„ 1:400	8	0,002	0,002
35	$C_4H_6O_6$	0,05 N	„ 1:400	8	0,0004	0,0008
36	$C_4H_6O_6$	0,05 N	„ 1:400	8	0,0004	0,0008
37	$C_4H_6O_6$	0,025 N	„ 1:400	7	0,0004	0,0008
38	$C_4H_6O_6$	0,025 N	„ 1:400	7	0,0004	0,0008

Tabelle VI.

Natriumarseniat. Natrium- und Kaliumarsenit.

Nr.	Reagens	Konzentration des Reagens	Konzentration des Ferments	N_2 des letzten farblosen Probierröhrchens[1]	Quantität der Fermenteinheiten
39	H_2O	—	Speichel 1:25	5	32
40	Na_2HAsO_4[2]	0,05 N	„ 1:25	3	8
41	Na_2HAsO_4	0,05 N	„ 1:25	3	8
42	Na_2HAsO_3	0,1 N	„ 1:25	2	4
43	Na_2HAsO_3	0,1 N	„ 1:25	2	4
44	H_2O	—	„ 1:25	5	32
45	K_2HAsO_3	0,1 N	„ 1:25	2	4
46	K_2HAsO_3	0,1 N	„ 1:25	2	4

[1]) Die Salze der arsenigen Säure binden Jod.

[2]) 0,1672 g Na_2HAsO_4 12 H_2O, gibt 0,064 g $Mg_2As_2O_7$. As wurde gefunden : 18,78 Proz., berechnet : 18,66 Proz.

Tabelle VII.

Natriumarseniat. Natrium- und Kaliumarsenit.

Nr.	Reagens	Konzentration des Reagens	Konzentration des Ferments	N_2 des letzten gefärbten Probierröhrchens	Hemmende Konzentration	
					Molekular	Proz. im Gemenge
47	Na_2HAsO_4	0,05 N	Speichel 1:400	3	0,0125	0,019
48	Na_2HAsO_4	0,05 N	„ 1:400	3	0,0125	0,019
49	Na_2HAsO_4	0,1 N	„ 1:400	4	0,0125	0,019
50	Na_2HAsO_4	0,1 N	„ 1:400	4	0,0125	0,019
51	Na_2HAsO_3	0,1 N	„ 1:400	4	0,0125	0,018
52	Na_2HAsO_3	0,1 N	„ 1:400	4	0,0125	0,018
53	K_2HAsO_3	0,1 N	„ 1:400	4	0,0125	0,021
54	K_2HAsO_3	0,1 N	„ 1:400	4	0,0125	0,021

Vergleichende Tabelle VIII.

Nr.	Reagens	Konzentration des Reagens	Konzentration des Ferments	N_2 des letzten gefärbten Probierröhrchens	Hemmende Konzentration		
					Molekular	Proz. im Gemenge	Proz. As u. Sb.
55	$SbCl_3$	0,01 N	Speichel 1:400	9	0,00004	0,00008	0,00004
56	$SbCl_3$	0,005 N	„ 1:400	8	0,00004	0,00008	0,00004
57	$C_4H_4O_6{<}^{K}_{SbO}$	0,18 N	„ 1:400	9	0,0007	0,003	0,0011
58	$C_4H_4O_6{<}^{K}_{SbO}$	0,06 N	„ 1:400	7	0,0009	0,004	0,0015
59	$C_4H_4O_6{<}^{K}_{SbO}$	0,018 N	„ 1:400	6	0,0006	0,002	0,0007
60	Na_2HAsO_3	0,1 N	„ 1:400	4	0,0125	0,018	0,008
61	K_2HAsO_3	0,1 N	„ 1:400	4	0,0125	0,021	0,008
62	Na_2HAsO_4	0,1 N	„ 1:400	4	0,0125	0,019	0,008

Wasserstoffionen, die in solchen Verdünnungen den Prozeß beschleunigen, zugeschrieben werden. Was den Brechweinstein anbetrifft, so gehen hier die Resultate sehr stark auseinander: nach unseren Beobachtungen offenbaren minimale Dosen von 0,05 bis 0,00005 Proz. keine beschleunigende Wirkung auf den Prozeß, während eine Hemmung nicht nur bei 0,1 Proz. sondern schon bei 0,002 Proz. desselben im Medium sich deutlich bemerkbar macht. Ein solcher Unterschied in den Angaben läßt sich nur durch die Verschiedenheit der Methoden erklären. *Chittenden* und *Peinter* bestimmten das Reduktionsvermögen der Reaktionsprodukte, wir dagegen das Verschwinden der Jodreaktion bei der Stärke. Manche Autoren[1]) halten die Amylase für ein komplexes Ferment, welches wenigstens aus zwei Fermenten bestehe, einem die Stärke verflüssigenden und sie in Dextrine überführenden, der eigentlichen *Amylase*, und aus *Dextrinase*, die den Zerfall der Dextrine

[1]) *J. A. Smorodinzew*, Die Fermente des Pflanzen- und Tierreichs 2, 164, 1920 (russisch).

bis zur Maltose bewirke. Diese Beobachtungen bestätigen in einem gewissen Grade die Theorie der Komplexität der Amylase[1]).

Die beschleunigende Wirkung minimaler Dosen von Antimonchlorid unterscheidet sich wenig von derjenigen ebensolcher Dosen von Salzsäure und dürfte ausschließlich von dieser letzteren abhängen. Zum Unterschied vom lebenden Protoplasma[2]) legt die Amylase eine größere Empfindlichkeit dem Antimon (0,00004 Proz. Sb gegen 0,007 Proz. As) gegenüber an den Tag, während das Arsen sich für die lebenden Organismen als giftiger erweist. Diese Tatsache kann als Beweis für die Unabhängigkeit der fermentativen Wirkung vom lebendigen Zustand des Protoplasmas dienen.

Zusammenfassung.

1. Alle von uns untersuchten Arsen- und Antimonpräparate wirken hemmend auf die Spaltung der Stärke durch die Speichelamylase.

2. Antimontrichlorid hemmt diesen Prozeß in einer Konzentration von 0,01 bis 0,00004 normal, d. h. bei 0,02 bis 0,00008 Proz. Gehalt.

3. Brechweinstein entfaltet seine hemmende Wirkung in einer Konzentration von 0,18 bis 0,0006 normal, d. h. bei 0,6 bis 0,002 Proz. Gehalt.

4. 0,1 bis 0,0125 normal, d. h. 0,16- bis 0,02proz. K_2HAsO_3 legten eine hemmende Wirkung an den Tag.

5. 0,1 bis 0,0125 normal oder 0,14- bis 0,018proz. Na_2HAsO_3 wirkten ebenso.

6. Na_2HAsO_4 entfaltet eine hemmende Wirkung bei einer Konzentration von 0,1 bis 0,0125 Normallösung, d. h. bei einem Gehalt von 0,15 bis 0,019 Proz.

7. 0,02- bis 0,00002proz. Brechweinsteinlösungen, 0,015- bis 0,000015proz. Na_2HAsO_4, 0,016- bis 0,000016proz. K_2HAsO_3 und 0,015- bis 0,000015proz. Na_2HAsO_4 üben keine beschleunigende Wirkung auf die Speichelamylase aus.

8. Antimontrichlorid beschleunigt die Wirkung der Amylase bei einem 0,00004proz. Gehalt desselben im Medium.

9. Diese Beschleunigung dürfte auf die Gegenwart der Salzsäure im Medium zurückzuführen sein, welche einen solchen Effekt bei 0,0004 Proz. an den Tag legt.

10. Weinsteinsäure hemmt die Wirkung des Ptyalins 40mal stärker als Salzsäure (Tabelle V), wenn man ihren Prozentgehalt im Medium in Betracht zieht, 20mal beim Vergleich ihrer Molekularlösungen.

[1]) *J. A. Smorodinzew* und *A. S. Nowikow*, diese Zeitschr. **140**, 12, 1923; *U. Olsson*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **119**, 1, 1922.

[2]) *A. Wöber*, Angew. Botanik **2**. 161. 1920.

11. Minimale (0,009- bis 0,000009proz.) Dosen Weinsäure üben auf die Verdauung der Stärke keine beschleunigende Wirkung aus.

12. Die Antimonpräparate haben sich in bezug auf die Amylase giftiger als die Arsenpräparate erwiesen, im Gegensatz zu der Wirkung dieser Substanzen auf lebendige Organismen.

13. Die Kalium- und Natriumarsenite wirken analog in äquivalenten Konzentrationen, folglich hängt der Prozeß in diesem Falle nicht von den Kationen ab.

14. Die Arsenite wirken ebenso wie die Arseniate.

15. Die Untersuchungen über den Einfluß der Arsen- und Antimonpräparate auf die Speichelamylase zeugen für die Komplexität dieses Ferments, das wenigstens zwei selbständige Ingrediente enthält.

Darstellung stickstoffhaltiger Melanine.

Von

Oskar Adler (Karlsbad).

(Eingegangen am 16. Juli 1923.)

Während die stickstofffreien Melanine (Humine) besonders im Pflanzenreiche gefunden werden und als Abkömmlinge pflanzlicher Bestandteile im Mineralreiche (Torf, Braunkohle) ein häufiges Vorkommen bilden, spielen die stickstoffhaltigen Melanine bei den *tierischen* Lebewesen eine wichtige Rolle. Im besonderen sind die Geschwulstmelanine stets stickstoffhaltig gefunden worden.

Ich habe daher im Anschluß an die Darstellung des stickstofffreien Benzolmelanins[1]) zwei stickstoffhaltige Melanine dargestellt. Als Ausgangsprodukte wählte ich zwei Aminosäuren: die p-Aminobenzoesäure und das Tyrosin. Diese wurden vorerst in der bereits geschilderten Weise (l. c.) in die entsprechenden Melaninsäuren übergeführt. Die so erhaltenen Substanzen bezeichne ich als p-Aminobenzoesäuremelaninsäure und Tyrosinmelaninsäure.

Die p-Aminobenzoesäuremelaninsäure stellt ein schwarzes hygroskopisches Pulver dar, welches in Alkalien leicht löslich, desgleichen löslich ist in 96proz. Alkohol, dagegen unlöslich in verdünnten Säuren und in Äther.

Die Tyrosinmelaninsäure habe ich bereits vor 13 Jahren dargestellt[2]) (die Substanz hatte ich damals als Tyrosinschwarz bezeichnet). Sie bildet ein tief dunkelbraunes, fast schwarzes, hygroskopisches Pulver, welches in Alkalien leicht löslich ist und aus diesen Lösungen durch Zusatz von Säuren in dunklen Flocken ausfällt. In 96proz. Alkohol und in Äther ist sie nicht löslich. Mit den Schwermetallen bildet sie in Wasser unlösliche Salze, die Alkalisalze dagegen sind in Wasser leicht löslich. Auch gelang es mir, mit organischen Basen, und zwar mit Strychnin und mit Chinin, Salze der beiden Melaninsäuren darzustellen durch Einengen der mit den freien Basen versetzten kolloiden wässerigen Lösungen der Melaninsäuren auf dem Wasserbade.

---

[1]) Diese Zeitschr. **187**, 201, 1923.

[2]) Zeitschr. f. Krebsforsch. **11**, H. 1, 1911.

Beide hier beschriebenen Melaninsäuren zeigen reduzierende Eigenschaften. Bei anhaltendem Waschen gehen beide Substanzen, sobald sie von den anhaftenden Salzen und Säuren befreit werden, allmählich in kolloide Lösung über. Sie können demnach durch Dialyse gereinigt werden.

Die Natriumsalze der beiden Melaninsäuren wirken sowohl in vitro als auch bei intravenöser Infusion beim lebenden Tiere hemmend auf die Blutgerinnung, worüber bezüglich der Tyrosinmelaninsäure bereits eingehend berichtet wurde[1]).

Bei dieser Gelegenheit sei auf einige Literaturangaben hingewiesen, auf welche ich in letzter Zeit aufmerksam wurde. Im Jahre 1900 erwähnen *Cross*, *Bevan* und *Heiberg*[2]) anläßlich der Schilderung der Oxydation von Benzol mit Wasserstoffsuperoxyd und Eisensulfat neben der Entstehung von Phenol, Brenzcatechin und Hydrochinon die Bildung eines „braunen amorphen Pulvers“. Die genannten Autoren haben dieses Produkt nicht genauer beschrieben, es ist aber auf Grund meiner Untersuchungen anzunehmen, daß sie die von mir später dargestellte Benzolmelaninsäure in Händen hatten. Im Jahre 1909 beschrieben *Kikoji* und *Neuberg*[3]) die Bildung melaninsäureartiger Produkte aus verschiedenen aromatischen Verbindungen und ebenfalls aus stickstoffhaltigen zyklischen Substanzen, wie Pyrrol, Tyrosin, Phenylalanin und Tryptophan unter der Einwirkung von Wasserstoffsuperoxyd und Eisensalz. Schließlich erwähnt *de Stöcklin*[4]) (1908) eine „künstliche Peroxydase“ (Eisentannat), welche sich bei Gegenwart von Wasserstoffsuperoxyd gegenüber Tyrosin ähnlich verhält wie Tyrosinase.

Die Überführung der beiden stickstoffhaltigen Melaninsäuren in die entsprechenden Anhydride (Melanine) erfolgte in glatter Weise nach dem von mir beschriebenen Verfahren durch Erhitzen der trockenen Substanzen auf 270°[5]). Auf diese Weise wurden erhalten das p-Aminobenzoesäuremelaninsäureanhydrid (p-Aminobenzoesäuremelanin) und das Tyrosinmelaninsäureanhydrid (Tyrosinmelanin). Diese Melanine bilden schwarze amorphe Pulver, die sich durch ihre Unlöslichkeit in den üblichen Lösungsmitteln einschließlich wässerigen Alkalilösungen charakterisieren. Sie verhalten sich in ihren Eigenschaften den Geschwulstmelaninen analog und lassen sich ebenso wie diese durch anhaltendes Erhitzen mit starken Alkalilösungen oder durch vorsichtige Kalischmelze wieder in die betreffenden Melaninsäuren aufspalten.

---

[1]) *O. Adler* und *W. Wiechowski*, Arch. f. exper. Path. u. Pharm. **92**, 22, 1922.

[2]) *C. F. Cross*, *E. J. Bevan* und *Th. Heiberg*, Ber. d. deutsch. chem. Ges. **33**, 2015, 1900.

[3]) *T. Kikoji* und *C. Neuberg*, diese Zeitschr. **20**, 523, 1909.

[4]) *de Stöcklin*, C. r. de l'Acad. des Science **147**, 1489, 1908; zitiert nach Biochem. Handlexikon **4**, 2. Hälfte, S. 692, 1911.

[5]) Diese Zeitschr. **137**, 202, 1923.

Die Elementaranalyse der beschriebenen Substanzen stieß auf erhebliche Schwierigkeiten. Mit Rücksicht auf die geringen zur Verfügung stehenden Substanzmengen wurden ausschließlich Mikroanalysen nach *Pregl* vorgenommen, deren Ausführung ich dem großen Entgegenkommen des Herrn Dozenten Dr. *H. Lieb* (Graz) und seines Mitarbeiters Herrn Dr. *Wintersteiner* verdanke. Die Schwierigkeiten lagen, wie mir Herr Dr. *Lieb* freundlichst mitteilte, einerseits in den hygroskopischen Eigenschaften und andererseits in der Schwerverbrennlichkeit der Substanzen. Jede Einwage mußte zur Gewichtskonstanz besonders getrocknet werden. Auch war ein besonders rasches Einbringen in das Verbrennungsrohr notwendig. Beim Mikro-*Dumas* machte sich die Bildung schwer verbrennlicher stickstoffhaltiger Kohle störend geltend, so daß ein Überhitzen des Rohres kaum zu umgehen war. Schließlich wurde auf die *Dumas*werte überhaupt verzichtet und statt deren der Stickstoff mittels Mikro-*Kjeldahl* nach *Pregl* bestimmt. Da auch hierbei bei Verwendung des üblichen Zerstörungsgemisches ($H_2SO_4 + CuSO_4 + K_2SO_4$) die Zerstörung der Substanzen sehr träge vor sich ging, wurden im Sinne der Angaben von *Mandel* und *Neuberg*[1]) einige Tropfen *Merck*schen Perhydrols allmählich zugesetzt. Auf diese Weise konnte die Zerstörung der Substanz in etwa 10 Minuten durchgeführt werden. Schließlich gelang es der großen Erfahrung des Herrn Dozenten Dr. *Lieb*, alle Schwierigkeiten zu überwinden, und es wurden sowohl bezüglich der CH-Werte als auch der N-Werte gut übereinstimmende Zahlen erzielt. Ich benutze diese Gelegenheit, den Herren Dozenten Dr. *Lieb* und Dr. *Wintersteiner* auch an dieser Stelle meinen Dank zum Ausdruck zu bringen. Die außerordentliche Bedeutung der quantitativen Mikroanalyse nach *Pregl* tritt bei derartigen biochemischen Untersuchungen, bei welchen so geringe Substanzmengen zur Verfügung stehen, besonders hervor.

Über die sich ergebenden Fragen bezüglich der Konstitution der beschriebenen Verbindungen soll erst gesprochen werden, wenn die Reihe dieser Arbeiten zu einem gewissen Abschluß gekommen sein wird.

Darstellung der p-Aminobenzoesäuremelaninsäure.

3 g p-Aminobenzoesäure wurden in 150 ccm Wasser suspendiert und hierauf unter Rühren allmählich 30 ccm 3proz. Wasserstoffsuperoxyds und 5 ccm 10proz. Eisenchloridlösung zugefügt. Das Reaktionsgemisch wurde 1 Stunde unter häufigem Rühren auf 85° gehalten. Sodann wurde mit 5 ccm 10proz. Salzsäure versetzt und 3 Stunden bei Zimmertemperatur stehengelassen. Der erhaltene Niederschlag wurde scharf abgesaugt, mit 600 ccm Wasser, sodann mit wenig 96proz. Alkohol und schließlich mit Äther gewaschen. Die erhaltene Substanz wurde vorerst am elektrisch

[1]) *Mandel* und *Neuberg*, Diese Zeitschr. 71, 196, 1915.

beheizten Luftbade bei 35° und schließlich im Exsikkator über Schwefelsäure bei Zimmertemperatur getrocknet. Ausbeute: 1,7 g entsprechend 56,6 Proz. des verwendeten Ausgangsmaterials.

Schwarzes Pulver. Leicht löslich in wässerigen Alkalien, ziemlich leicht löslich in 96proz. Alkohol, unlöslich in verdünnten Säuren, Äther und Petroläther. Reduziert ammoniakalische Silberlösung unter Zusatz von Natronlauge bei leichtem Anwärmen unter Bildung eines Silberspiegels.

1. 5,126 mg Substanz: 0,066 mg Asche entsprechend 1,29 Proz. 5,060 mg aschefreie Substanz: 11,08 mg CO_2, 1,92 mg H_2O entsprechend 59,71 Proz. C, 4,21 Proz. H.

2. 4,847 mg Substanz: 0,047 mg Asche entsprechend 0,96 Proz. 4,424 mg aschefreie Substanz: 10,495 mg CO_2, 1,87 mg H_2O entsprechend 59,05 Proz. C, 4,28 Proz. H.

3. 6,525 mg aschefreie Substanz verbrauchten 3,80 ccm n/100 HCl entsprechend 8,16 Proz. N.

4. 7,381 mg aschefreie Substanz verbrauchten 4,30 ccm n/100 HCl entsprechend 8,16 Proz. N.

Überführung der p-Aminobenzoesäuremelaninsäure in p-Aminobenzoesäuremelanin.

1,14 g der trockenen Melaninsäure wurden in locker bedecktem Uhrglase im Wärmeschrank 1 Stunde auf 270° erhitzt. Nach dem Erkalten wurde die Substanz in der Reibschale gepulvert, sodann mit 25 ccm 2proz. Natronlauge verrührt und unter häufigem Umrühren durch 16 Stunden unter der Einwirkung der Natronlauge belassen. Die stark dunkle Lösung wurde vorsichtig dekantiert und der dunkle Niederschlag auf der Zentrifuge mit Wasser sorgfältig ausgewaschen. Sodann wurde der Niederschlag mit 25 ccm 10proz. Salzsäure in der Reibschale verrührt und wiederum 16 Stunden unter oftmaligem Umrühren stehengelassen. Hierauf wurde der Niederschlag mit viel Wasser, schließlich mit Äther und Alkohol gewaschen und zuletzt im elektrisch beheizten Luftbade bei 35°, schließlich im Wärmeschrank bei 120° getrocknet.

Das so erhaltene p-Aminobenzoesäuremelanin bildet ein schwarzes amorphes Pulver, welches in verdünnten kalten Alkalien und verdünnten Säuren und den sonstigen Lösungsmitteln unlöslich ist.

1. 4,519 mg Substanz: 0,036 mg Asche entsprechend 0,8 Proz. 4,483 mg aschefreie Substanz: 11,11 mg CO_2, 1,36 mg H_2O entsprechend 67,58 Proz. C, 3,37 Proz. H.

2. 4,115 mg Substanz: 0,03 mg Asche entsprechend 0,73 Proz. 4,085 mg aschefreie Substanz: 10,145 mg CO_2, 1,425 mg H_2O entsprechend 67,73 Proz. C, 3,87 Proz. H.

3. 6,02 mg aschefreie Substanz verbrauchten 4,27 ccm n/100 HCl entsprechend 9,95 Proz. N.

4. 7,053 mg aschefreie Substanz verbrauchten 4,91 ccm n/100 HCl entsprechend 9,76 Proz. N.

Darstellung der Tyrosinmelaninsäure.

6 g Tyrosin wurden in 200 ccm Wasser suspendiert, 80 ccm 3proz. Wasserstoffsuperoxyds und 10 ccm 10proz. Eisenchloridlösung zugefügt und das Gemisch innerhalb 1 Stunde unter Rühren langsam auf 60° erwärmt.

Sodann wurden in kleinen Portionen noch 20 ccm 3proz. Wasserstoffsuperoxyds zugesetzt und innerhalb der nächsten Viertelstunde unter Rühren auf 80° erwärmt. Bei dieser Temperatur wurde durch 10 Minuten belassen, hierauf nochmals portionsweise 20 ccm 3proz. Wasserstoffsuperoxyds zugesetzt und schließlich das Reaktionsgemisch unter häufigem Umrühren durch 3 Stunden bei Zimmertemperatur sich selbst überlassen. Sodann wurde mit Natronlauge möglichst genau neutralisiert. Nach 20 stündigem Stehen bei Zimmertemperatur wurde von dem bei der Reaktion unverbrauchten Tyrosin (etwa 2 g) abfiltriert (Filtrat I). Das unverbrauchte Tyrosin wurde vom Filter entfernt, in 200 ccm Wasser aufgenommen, mit 40 ccm 3proz. Wasserstoffsuperoxyds und 3 ccm 10proz. Eisenchloridlösung versetzt und innerhalb 20 Minuten unter Rühren auf 80° erwärmt. Nach dem Erkalten wurde mit Natronlauge möglichst genau neutralisiert, durch 36 Stunden bei Zimmertemperatur stehengelassen und sodann filtriert (Filtrat II). Am Filter verblieben nur einige Milligramm unverbrauchten Tyrosins. Die vereinigten Filtrate (I und II) wurden mit dem gleichen Volumen Wasser verdünnt, mit Salzsäure schwach angesäuert und durch 5 Stunden bei Zimmertemperatur stehengelassen. Von dem reichlich entstandenen dunklen Niederschlag wurde an der Pumpe abgesaugt und der Niederschlag mit Wasser chlorfrei gewaschen. Gegen Ende des Waschens ging eine geringe Menge des Niederschlages in kolloider Lösung durchs Filter. Schließlich wurde mit 96proz. Alkohol, dann mit Äther gewaschen, der Äther durch Nachsaugen von Luft verjagt und die so gewonnene Substanz am elektrisch beheizten Luftbade bei 35°, dann im Exsikkator über Schwefelsäure bei Zimmertemperatur getrocknet. Ausbeute an Tyrosinmelaninsäure 2,3 g entsprechend 38 Proz. des verwendeten Tyrosins.

Schwarzes, amorphes Pulver. In reinem feuchten Zustande in Wasser kolloidal löslich. In trockenem Zustande leicht löslich in wässerigen Alkalien, auch in Natriumcarbonat und Ammoncarbonatlösungen mit tief dunkelbrauner Farbe. In verdünnten Säuren ist die Substanz unlöslich. In konzentrierter Schwefelsäure und rauchender Salzsäure, desgleichen in starker Salpetersäure leicht löslich bei 17° mit dunkler Farbe. Beim Erhitzen der salpetersauren Lösung tritt Aufhellung zu weniger gefärbten bzw. farblosen Oxydationsprodukten ein. In Pyridin löst sich die Substanz in geringer Menge, dagegen ist sie praktisch unlöslich in absolutem Alkohol, Methylalkohol, Aceton, Äther, Chloroform und Petroläther.

Zur Elementaranalyse wurde im Vakuum (1 mm Hg) über Schwefelsäure bei Zimmertemperatur getrocknet.

1. 4,375 mg Substanz: 0,129 mg Asche entsprechend 2,95 Proz. 4,246 mg aschefreie Substanz: 8,49 mg CO_2, 1,48 mg H_2O entsprechend 54,53 Proz. C, 3,87 Proz. H.

2. 4,658 mg Substanz: 0,136 mg Asche entsprechend 2,91 Proz. 4,522 mg aschefreie Substanz: 9,02 mg CO_2, 1,41 mg H_2O entsprechend 54,40 Proz. C, 3,46 Proz. H.

3. 7,45 mg aschefreie Substanz verbrauchten 3,40 ccm n/100 HCl entsprechend 6,42 Proz. N.

4. 9,315 mg aschefreie Substanz verbrauchten 4,34 ccm n/100 HCl entsprechend 6,54 Proz. N.

5. 8,819 mg aschefreie Substanz verbrauchten 4,11 ccm n/100 HCl entsprechend 6,54 Proz. N.

Überführung der Tyrosinmelaninsäure in Tyrosinmelanin.

1 g der Melaninsäure wurde im locker bedeckten Uhrglase im Wärmeschrank 2 Stunden auf 270° erhitzt. Nach dem Erkalten wurde die Substanz in der Reibschale fein gepulvert, mit 25 ccm 2proz. Natronlauge verrührt und unter häufigem Umrühren durch 16 Stunden unter Einwirkung der Natronlauge belassen. Von der dunkelbraunen Flüssigkeit (unveränderte Tyrosinmelaninsäure) wurde abgesaugt, der dunkle Niederschlag mit viel Wasser, dann mit Alkohol und Äther an der Saugpumpe gewaschen und der Äther durch Nachsaugen von Luft verjagt. Die Substanz wurde dann zur Entfernung des anhaftenden Eisens mit 25 ccm 10proz. Salzsäure in der Reibschale verrieben und unter häufigem Umrühren durch 36 Stunden stehengelassen. Hierauf wurde die Salzsäure durch Waschen mit Wasser entfernt, dann die Substanz mit Alkohol und Äther gewaschen und vorerst am elektrisch beheizten Luftbade bei 35°, dann im Exsikkator über Schwefelsäure und schließlich über Phosphorpentoxyd getrocknet. Ausbeute an Tyrosinmelanin 0,2 g entsprechend 20 Proz. der verwendeten Tyrosinmelaninsäure bzw. 7,7 Proz. des als Ausgangsmaterial verwendeten Tyrosins.

Die Substanz bildet ein schwarzes Pulver, welches unlöslich ist in kalten Alkalien und verdünnten Säuren und den sonstigen üblichen Lösungsmitteln. Durch längeres Erhitzen mit starker Natronlauge bzw. durch vorsichtiges kurzes Schmelzen mit Natriumhydroxyd konnte die Substanz wieder in die Tyrosinmelaninsäure aufgespalten werden.

Zur Elementaranalyse wurde die Substanz noch durch 2 Stunden im Wärmeschrank bei 120° getrocknet.

1. 4,429 mg Substanz: 0,049 mg Asche entsprechend 1,11 Proz. 4,380 mg aschefreie Substanz: 9,69 mg CO_2, 1,18 mg H_2O entsprechend 60,33 Proz. C, 2,98 Proz. H.

2. 4,863 mg Substanz: 0,051 mg Asche entsprechend 1,04 Proz. 4,812 mg aschefreie Substanz: 10,64 mg CO_2, 1,20 mg H_2O entsprechend 60,30 Proz. C, 2,77 Proz. H.

3. 10,213 mg aschefreie Substanz verbrauchten 9,17 ccm n/100 HCl entsprechend 12,60 Proz.

4. 5,265 mg aschefreie Substanz verbrauchten 4.67 ccm n/100 HCl entsprechend 12,45 Proz. N.

Über den Einfluß des Sauerstoffs auf die assimilatorische und dissimilatorische Tätigkeit der Hefe.

I. Teil.

Verhalten der Dextrose.

Von

Harry Lundin.

(Aus der chemischen Abteilung des Wiener physiologischen Universitätsinstituts.)

(Eingegangen am 16. Juli 1923.)

Mit 1 Abbildung im Text.

Inhaltsverzeichnis.

Einleitung.

Alle Stoffe, die in der Zelle oxydiert werden oder dort sonstigen energieliefernden Umwandlungen (anoxybiotischen Vorgängen, gewisse Assimilationen, Gärung usw.) unterliegen, können als Energiequellen dienen. Als solche Stoffe kommen in erster Linie diejenigen in Betracht, die beim Kohlehydratstoffwechsel eine Rolle spielen. Diese

Stoffe können teilweise verbrannt werden und dabei Energie für den Aufbau des unverbrannten Restes zu energiereichen, leicht mobilisierbaren Reservestoffen liefern, wie es *O. Meyerhof* bei der Rückumwandlung der in dem lebenden Muskel verschwindenden *Milchsäure* zu Zucker bzw. Glykogen annimmt. Bei anderen synthetisierenden Prozessen, wo die für die Synthese verwendete Verbindung energiereicher als eine äquivalente Menge der Endprodukte ist, z. B. bei der Assimilation von *Äthylalkohol* zu höheren Kohlehydraten, wird Energie in Freiheit gesetzt, die von der Zelle zum Teil oder vollständig ausgenutzt werden kann. Je nach Bedarf werden die in der einen oder anderen Weise erhaltenen Reservestoffe oxydiert und verbrannt. Schließlich können Spaltungen, wo Sauerstoff nicht mitwirken muß, z. B. *Gärungsvorgänge* energieliefernd verlaufen.

Vorliegende Abhandlung behandelt *vom Gesichtspunkte der Energiewandlungen aus die Assimilations- und Dissimilationsvorgänge*, die eintreten, wenn zu einer Suspension von *Hefe* in Wasser verschiedene Stoffe, *Zuckerarten, Alkohol* und *einige organische Säuren mit oder ohne Zufuhr von Sauerstoff zugesetzt werden.*

Die vorliegenden Versuche sind als eine Fortsetzung folgender Untersuchungen zu betrachten: *Fürth* und *Lieben* haben in zwei kürzlich in dieser Zeitschrift publizierten Aufsätzen über *die oxydative Zerstörung von Milchsäure*[1]) *durch sauerstoffgeschüttelte Hefe* berichtet. Später hat *Lieben* unter Benutzung derselben Versuchsmethodik das Verhalten der *Brenztraubensäure* und des *Acetaldehyds*[2]) sowie einiger *Aminosäuren*[3]) untersucht.

Fürth und *Lieben* wiesen nach, „daß es bei der Zerstörung von Milchsäure durch die Hefe vor allem darauf ankommt, daß Sauerstoff in möglichst innigen Kontakt mit den lebenden Hefezellen tritt und daß eine ungehinderte Abgabe gasförmiger Stoffwechselprodukte, insbesondere der Kohlensäure, durch die Zelle ermöglicht werde". Als weitaus die beste Versuchsanordnung erwies sich die Verwendung eines Schüttelkolbens, durch den ein Sauerstoffstrom durchgeleitet und in dem die betreffenden Suspensionen in steter schwingender Bewegung erhalten werden konnten. Mit dieser Versuchsanordnung gelang es, in einigen Stunden eine ausgiebige Zerstörung milchsauren Natrons zu erzielen. Etwa die Hälfte des Kohlenstoffs der verschwundenen Milchsäure findet man in der Regel als CO_2. Der Rest war für einen Neuaufbau organisierter Hefenleibesubstanz, deren Bildung sich in diesem Falle ohne Vorhandensein einer Stickstoffquelle vollzog, in Anspruch genommen worden.

Die Versuche von *Lieben* über einige *Aminosäuren* (Alanin, Asparaginsäure, Glykokoll, Tyrosin und Acetamid) gipfelten darin, daß dieselben nicht wie die Milchsäure schnell zerstört wurden, sondern in einer Menge von 60 bis 80 Proz. in der Hefesuspension wiederzufinden sind, während der Rest ohne CO_2-Entwicklung von der Hefe konsumiert wird. *Lieben*

---

[1]) *O. Fürth* und *F. Lieben*, diese Zeitschr. **128**, 144—168; **132**, 165—179.
[2]) *F. Lieben*, ebendaselbst **135**, 240.
[3]) *Derselbe*, ebendaselbst **132**, 180—187.

konstatierte weiter, daß sich das Natriumsalz der *Brenztraubensäure* so wie das entsprechende Salz der Milchsäure verhielt. Die Brenztraubensäure wird also zum Teil unter reichlicher CO_2-Entwicklung, ohne aber Acetaldehyd zu bilden, zerstört, zum Teil aber von der Hefe zum Aufbau ihrer Körpersubstanz verbraucht. *Acetaldehyd* wird nur sehr wenig von Preßhefe angegriffen.

Methodik.

Die in den folgenden Versuchen verwendete Methodik war dieselbe, die *Fürth* und *Lieben* benutzten[1]).

In den Schüttelkolben 2 wurde Preßhefe (meistens 50 g) und eine Lösung (meistens 500 ccm) von der zu untersuchenden Substanz eingeführt. Von der Bombe 1 wird ein Sauerstoffstrom durch die in steter schwingender Bewegung befindliche Hefesuspension geleitet. Um die entwickelte Kohlen-

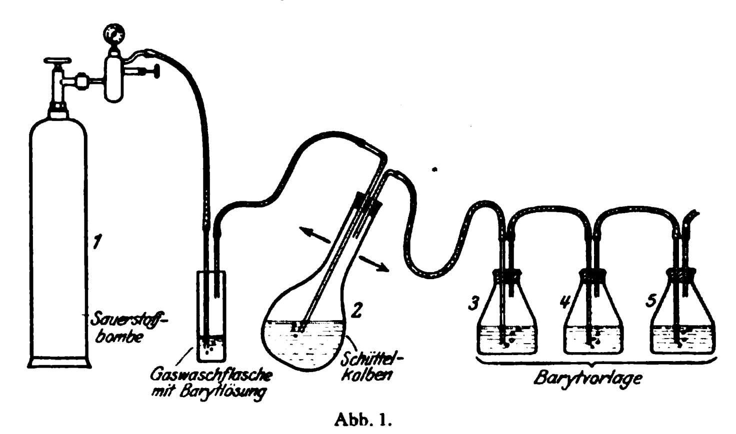


Abb. 1.

säure zu absorbieren, wurden drei Barytvorlagen (3, 4 und 5, jede mit meistens 400 ccm n/5 Barytlösung) hinter dem Schüttelkolben eingeschaltet. Wie die Versuche zeigen, erreicht man dadurch eine vollständige Absorption von CO_2, und nach denselben Versuchen kann die gebildete Kohlensäure durch Titration mit n/2 Salzsäure (Phenolphthalein) bestimmt werden.

Die Kohlensäure stammt aber nicht nur aus den zugesetzten Substanzen, sie wird auch durch die Lebenstätigkeit der Hefe allein gebildet. Um diese Menge, die nicht auf Rechnung der in den Versuchen zugesetzten Substanzen geschrieben werden kann, zu eliminieren, ist immer neben der Hauptprobe A eine Blindprobe B, die genau so wie die Probe A behandelt wurde und dieselbe Hefemenge, aber statt der Substanzlösung dieselbe Menge destillierten Wassers enthielt, angestellt worden. Wenn wir also die in der Blindprobe gebildete Kohlensäuremenge von derjenigen der Hauptprobe abziehen, bekommen wir die Kohlensäuremenge, die die zugesetzte Substanz geliefert hat.

Unser Apparatensystem besteht also aus zwei gleichen Schüttelapparaten, A und B, je mit drei Barytvorlagen, um die von dem Sauerstoffstrom mitgerissene Kohlensäure abzufangen. In die eine, A, kommt die Hauptprobe, in die andere, B, die Blindprobe. Der Sauerstoff tritt in

[1]) Diese Zeitschr. 128, 158, 1922.

möglichst innigen Kontakt mit den Hefezellen, und eine unbehinderte Abgabe gasförmiger Stoffwechselprodukte findet statt.

In den Versuchen wurde immer Preßhefe aus der „Spiritus- und Preßhefefabrik Stadlau bei Wien, Wolfrum A.-G.“ verwendet. Eine Stickstoffnahrung haben wir der Preßhefe, die als obergärige Hefe am wählerischsten in dieser Hinsicht ist, nicht gegeben. Dies, weil wir immer die gleichen Versuchsbedingungen wünschten, denn die Ausnutzbarkeit einer Stickstoffquelle ist sehr stark von den zur Verfügung stehenden Kohlenstoffquellen abhängig[1]). Weil keine Stickstoffnahrung zugeführt worden ist, tritt auch keine Vermehrung der Zellenzahl der Hefe während der kurzen Versuchszeit ein; die hohe Hefekonzentration ist auch für eine solche ungünstig[2]). Dank der großen Hefemenge pflegt die Gärung trotz vollständigen Mangels an N-Nahrung und Nährsalzen rasch und glatt abzulaufen[3]).

Als Kohlenstoffquellen haben wir nun die verschiedenen Untersuchungsmaterialien verwendet, also Zuckerarten, Äthylalkohol, Citronensäure, Bernsteinsäure, Äpfelsäure, Weinsäure und Acetessigsäure.

Die filtrierten Suspensionen enthielten mit Ausnahme der zugesetzten Substanzen und ihrer löslichen Umwandlungsprodukte fast keine anderen Stoffe; die Hefe gibt nur sehr wenig Stickstoff an die Lösung ab (die Biuretreaktion und die *Heller*sche Probe waren beide negativ); hierdurch war die Ausführung der notwendigen Analysen in den Filtraten nie mit besonderen Schwierigkeiten verknüpft (vgl. S. 323).

Literaturangaben über die Assimilation der Zuckerarten durch Hefe zu Zellbestandteilen und Reservestoffen von Kohlehydratcharakter.

Schon *Pasteur* hat sich mit der Frage beschäftigt, ob Zucker gleichzeitig zur *Ernährung* und zur *Vergärung* von der Hefe ausgenutzt werden kann. Er stellte eine Versuchsreihe mit Saccharose an und fand, daß etwa 1 Proz. von dem Zucker assimiliert, der Rest aber zerstört wurde. *A. Mayer* verwendet geringere Hefemengen und bekam etwas niedrigere Werte[4]). *Lindet*[5]) schätzte die assimilatorische Tätigkeit der Hefe wesentlich niedriger ein. *Laurent*[6]) machte umfangreiche Versuche und konstatierte, daß neben den vergärbaren Zuckern eine Menge *organischer Säuren* und anderer organischer Verbindungen assimilierbar sind. *Beijerink*[7]) teilte die Hefen nach ihrem *Assimilationsvermögen* von verschiedenen Kohlehydraten ein. Es kommt vor, daß eine Hefeart einen Zucker zu *assimilieren* vermag, den sie nicht *vergärt* und ein Parallelismus zwischen den beiden Vorgängen

---

[1]) *A. Klöcker*, C. r. Lab. Carlsberg **14**, Nr. 7, S. 40, 1919.

[2]) *Hayduck* und *Anders*, Wochenschr. f. Brauerei **28**, 223, 1911.

[3]) *Th. Bokorny*, Allgem. Brauer- u. Hopfenz. 1921, S. 445–448. Die Stickstoffnahrung und ihre Konzentration ist für den Gärungsvorgang gleichgültig. Man kann sie ganz fortlassen, die Gärung geht trotzdem flott. Es besteht kaum ein Zusammenhang zwischen N-Nahrung und Gärung.

[4]) *A. Mayer*, Landwirtsch. Versuchsst. **16**, 301.

[5]) *L. Lindet*, Bull. de l'Assoc. des Chim. de Sucr. et Dist. **35**, 232–236, 1917; Chem. Centralbl. 1918, II, S. 387; C. r. d. l'Acad. d. scienc. **166**, 910–913; C. 1918, II, S. 746.

[6]) *E. Laurent*, Ann. Soc. Belge de Microscopie **14**, 29, 1890.

[7]) *Beijerink*, Centralbl. f. Bakt. **11**, 68, 1892.

besteht nicht immer[1]). Die obergärigen Brauereihefen vergären Glucose und Fructose, assimilieren sie aber nicht immer[2]). *Lindner* untersuchte die Assimilierbarkeit der *Dextrine* und fand, daß sie häufig assimiliert, aber nicht vergoren werden[3]). Nach *Klöcker* ist die Assimilation stark von der *N-Nahrung* und ihrer Zusammensetzung abhängig[4]). *Euler* sagt, daß der aufgenommene Zucker zur Synthese notwendiger Zellbestandteile des Plasmas usw. verwendet werden kann, also tatsächlich assimiliert werden kann, und dieser Teil steht wohl zum Gesamtwachstum der Hefe in konstanter Beziehung. Weiter wird zeitweise der Zucker bzw. das Kohlenstoffmaterial als Reservestoff in Form von *Glykogen* aufgespeichert, und die Aufnahme von Kohlenstoff braucht natürlich nicht mit der Zellvermehrung parallel zu gehen[5]). *Watermann* äußert sich folgendermaßen:

Bei den Pilzen wird der Kohlenstoff wie auch andere Elemente beim Stoffwechsel nicht sofort in Pilzsubstanz und die Endprodukte umgesetzt, sondern unter Bildung eines Zwischenproduktes, des Glykogens[6]), gespeichert. *Bokorny* hat eine Anzahl von Assimilationsversuchen von Hefe und verschiedenen Kohlehydraten angestellt. Als Maß für die Assimilation verwendete er die Trockensubstanzzunahme der Hefe. Am meisten benutzte er dabei 2 g Zucker in 25 ccm Harn (fünffach verdünnt) und setzte verschiedene Hefemengen dazu. Nach 5 bis 7 Tagen wurden die Lösungen untersucht. Er fand dabei, daß die Menge der Aussaathefe im Verhältnis zu der Zuckermenge eine große Rolle bei der Vermehrung der Hefe spielt[7]). Wenn größere Hefemengen zugesetzt wurden, konnte auch eine Abnahme der Trockensubstanz eintreten[8]). Dasselbe hatte schon *Euler*[9]) konstatiert. Die Vermehrung ist weiter von der *Temperatur* abhängig, und zwar ändert sich der Temperatureinfluß je nach der Aussaatmenge der Hefe[10]). *Wiederholter Zusatz* des Zuckers bei gleichbleibender Gesamtmenge erwies sich als förderlich. 0,01 proz. freie *Kalilauge* begünstigt die Assimilation[11]). Ungefähr 6 Proz. von der zugesetzten Dextrose wurden assimiliert. Maltose in Malzabsud wurde zu 14 Proz. aufgenommen. Überhaupt gab Dextrose ungünstigere Resultate als Saccharose und Maltose[12]). Die Verwertung des Zuckers zum Aufbau von Hefesubstanz ist am günstigsten bei 6 Proz. Zucker in der Lösung; niedrigere Konzentrationen sind weniger ungünstig

---

[1]) Vgl. *A. Klöcker*, C. r. d. Lab. Carlsberg **14**, Nr. 7, S. 40, 1919; C. 1920, I, S. 16.

[2]) *P. Lindner* und *Saito*, Wochenschr. f. Brauerei **27**, 509, 1910; **28**, 561, 1911.

[3]) *P. Lindner*, ebendaselbst **29**, 541, 1912.

[4]) *A. Klöcker*, C. r. d. Lab. Carlsberg **14**, Nr. 7, S. 40, 1919; C. 1920, I, S. 16.

[5]) *H. Euler*, Chemie der Hefe und der alkoholischen Gärung. Leipzig 1915, Akademische Verlagshandlung.

[6]) *Watermann*, Zeitschr. f. Gärungsphysiol. **5**, 5—9; C. 1915, I, S. 561.

[7]) *T. Bokorny*, Allgem. Brauer- u. Hopfenz. 1922, S. 1057—1060 und S. 1149—1150.

[8]) *Derselbe*, diese Zeitschr. **81**, 219—262.

[9]) *Euler* und *Lindner*, Chemie der Hefe und der alkoholischen Gärung.

[10]) *Th. Bokorny*, diese Zeitschr. **81**, 219—262.

[11]) *Derselbe*, Allgem. Brauer- u. Hopfenz. **57**, 477—480; C. 1917, II, S. 23.

[12]) *Derselbe*, diese Zeitschr. **188**, 64, 1917; C 1918, I, S. 122.

als höhere[1]). Die Anschauung, daß sich die Hefe bei größerer Verdünnung nicht vermehre, ist natürlich falsch; noch bei 0,1 bis 1 Proz. findet eine solche statt. *H. Elias* und *St. Weiss*[2]) berichten, daß Hefezellen in *sauren Medien* keine regelmäßigen Veränderungen des Glykogengehaltes zeigen; *in alkalischer* Lösung erfolgt eine Anreicherung an Glykogen und Gesamtkohlehydrat. *Zikes*[3]) fand, daß die *Konzentration der Würze* einen schwachen Einfluß auf die Gestalt und Form der Hefe ausübt; einen stärkeren auf ihre Größe. Je konzentrierter die Würze ist, desto größere und kräftigere Zellen werden gebildet; die Bildung von Glykogen geschieht rascher und kräftiger und ist dauerhafter. Bei der Untersuchung der Zuckerbilanz der alkoholischen Gärung zeigten *Harden* und *Young*[4]) zuerst, daß ein Teil des anscheinend verschwundenen Zuckers bei der zellfreien Gärung in eine alkalische Kupferlösung nicht mehr verändernde Substanz übergeht (14 bis 36 Proz.), die nach Hydrolyse mit Salzsäure in normaler Weise reduziert wird. *Buchner* und *Meisenheimer*[5]) wiesen darauf hin, daß die Entstehung dieses Körpers nur auf die Wirksamkeit eines im Preßsaft vorhandenen aufbauenden Enzyms zurückzuführen ist. Mit Unterhefe wurden Verluste in zwei Versuchen von 30 und 40 Proz. ohne Hydrolyse konstatiert. Mit Hydrolyse war der Verlust in fünf Versuchen 2 bis 11 Proz. Die Menge der mit Salzsäure hydrolysierbaren Polysaccharide betrug 6 bis 19 Proz.

Literatur über den Einfluß des Sauerstoffs auf die Gärung und die Assimilation.

Sauerstoff ist einer von den Faktoren, welche das Verhältnis Hefeernte: Alkoholausbeute beeinflussen. *Giltay* und *Aberson*[6]) fanden, daß bei starker Lüftung etwa drei Viertel des verschwundenen Zuckers der alkoholischen Gärung unterlagen, während beim Abschluß von Luft etwa 90 Proz. vergoren wurden. Der Gesamtverbrauch an Zucker wird durch reichliche Zufuhr von Sauerstoff nicht unerheblich vergrößert, was zum kleineren Teil auf der stärkeren Hefevermehrung beruht, hauptsächlich aber die Folge der unter diesen Umständen lebhafteren Oxydation bzw. Veratmung des Zuckers[7]) ist. „Die außerordentlich interessante Frage, ob es bei den gewöhnlichen Kulturhefen einen aerobischen Zustand gibt, bei welchem trotz Vorhandensein gärfähigen Zuckers keine Gärfähigkeit, sondern ausschließlich Oxydation durch die Zelle geübt wird, ist von *H. Buchner* und *Rapp* geprüft worden[8]). Sie züchteten Unterhefe auf

---

[1]) *Th. Bokorny*, Allgem. Brauer- u. Hopfenz. 1918, S. 1183—1184 und S. 1191—1192.

[2]) *H. Elias* und *St. Weiss*, diese Zeitschr. **127**, 1—12, 1922; C. 1922, I, S. 886.

[3]) *H. Zikes*, Zentralbl. f. Bakt. **49**, 2. Abt., S. 174—181.

[4]) *Harden* und *Young*, Ber. d. deutsch. chem. Ges. **37**, 1052; C. 1904, II, S. 51.

[5]) *Buchner* und *Meisenheimer*, Ber. d. deutsch. chem. Ges. **39**, 3201—3218; C. 1906, II, S. 1449.

[6]) *Giltay* und *Aberson*, Pringsheims Jahrb. f. wiss. Bot. **26**, 543.

[7]) Vgl. *Euler*, Chemie der Hefe und der alkoholischen Gärung, S. 227 und 242.

[8]) *E. Buchner*, *H. Buchner* und *M. Hahn*, Die Zymasegärung, S. 350ff. München 1903.

zuckerhaltiger Nährgelatine unter Luftdruck. Die Hefe befand sich also hier in freier Atmosphäre, aber kaum ein Siebentel des verbrauchten Zuckers wurde zerstört; sechs Siebentel fielen dem Gärungsvorgang anheim."

Zusammenfassend kann man sagen, daß, wenn Zuckerarten die einzige Kohlenstoffquelle sind und eine geeignete Stickstoffnahrung zur Verfügung steht, eine *Assimilation* der betreffenden Zuckerarten zu Leibes- und Reservesubstanzen der Hefe konstatiert worden ist. Eine mehr oder weniger starke Zellen- und Trockensubstanzvermehrung der Hefe ist die Folge dieser Assimilation, die durch Lüften befördert wird. Da man aber das Gärungs- oder Selbstgärungsstadium, in dem die Versuche unterbrochen und in dem die Assimilationsbestimmungen ausgeführt worden sind, nicht berücksichtigt hat, so sind Unstimmigkeiten entstanden, und man hat zuweilen statt einer erwarteten Zunahme eine Abnahme der Trockensubstanz gefunden; die bisherigen Versuche sind für Vergleiche in quantitativer Hinsicht nicht geeignet. In dem Hefepreßsaft ist ein aufbauendes Enzym vorhanden, das Zucker in eine alkalische Kupferlösung nicht mehr verändernde Substanz überführt, die mit Salzsäure zum Teil zu reduzierenden Verbindungen hydrolysiert werden kann. Die durch die Assimilation des Zuckers bedingten Trockensubstanzzunahmen sind in den bisherigen Versuchen, wegen der vorhandenen N-Quelle, hauptsächlich auf eine Vermehrung der Zellenzahl bezogen worden. Eingehendere Versuche bei konstanter Zellenzahl liegen nicht vor; überhaupt vermißt man nähere Untersuchungen über die Vorgänge bei der Assimilation und Aufspeicherung von Zuckerarten zu Zellbestandteilen und Reservestoffen von Kohlehydratcharakter.

Versuch 1.

Orientierungsversuch über Kohlensäure- und Alkoholbildung bei Sauerstoffschüttelung der Hefe.

A. Hauptprobe. Sauerstoffschüttelung. 50 g Preßhefe und 500 ccm Dextroselösung, enthaltend 3,5 g Dextrose = 535 ccm Totalvolumen, wurden in den Schüttelkolben A des oben beschriebenen Versuchsapparates eingebracht. Unter Sauerstoffdurchleitung wurde 9 Stunden geschüttelt. Über Nacht wurde der Kolben mit den Barytvorlagen im Eisschrank aufbewahrt (13 Stunden). Am nächsten Tage wurde wieder 8 Stunden im Sauerstoffstrom geschüttelt. 100 ccm der Versuchssuspension enthielten 0,65 g Dextrose.

Totale Versuchszeit: 17 Stunden.

Versuchstemperatur: 16 bis 20° C.

Reaktion der Versuchsflüssigkeit: vor dem Versuche neutral, nach dem Versuche sauer.

Trockensubstanz der Hefe: etwa 25 Proz. ihres Gewichtes.

In den Barytvorlagen konnte die gebildete Kohlensäure quantitativ bestimmt werden.

B. Blindprobe. Sauerstoffschüttelung. 50 g Preßhefe und 500 ccm destillierten Wassers = 535 ccm Totalvolumen wurden in den Schüttelkolben B eingebracht und dort genau so wie die Hauptproben behandelt. In den Barytvorlagen wurde die entwickelte Kohlensäure quantitativ aufgefangen.

C. Gewöhnliche Gärungsprobe. 50 g Preßhefe und 500 ccm Dextroselösung, enthaltend 3,5 g Dextrose = 535 ccm Totalvolumen, wurden in einem Kolben zwecks Verteilung der Hefe durchgeschüttelt und dann unverschlossen neben den beiden übrigen Proben während der ganzen Versuchszeit stehengelassen. Alle 2 oder 3 Stunden wurde kräftig durchgeschüttelt. 100 ccm der Suspension enthielten 0,65 g Dextrose.

1. Die in den Proben A und B gebildeten *Kohlensäuremengen* betrugen:

Zeit	Probe A g	Probe B g	Auf Rechnung des zugesetzten Zuckers kommen g
Nach 17h	5,5	1,9	3,6

(Die Kohlensäuremengen beziehen sich auf die totale, ursprüngliche Flüssigkeitsmenge, 535 ccm.)

2. *Der Zuckergehalt* der Versuchsflüssigkeiten wurde nach bestimmten Zeiten ermittelt. 20 ccm der sehr gut durchgeschüttelten Suspensionen wurden abpipettiert, mit 20 ccm destilliertem Wasser verdünnt und durch ein Faltenfilter mit etwas Kieselgur filtriert. In dem klaren und fast farblosen Filtrat wurde (wenn notwendig nach Verdünnung) der Zuckergehalt nach *Bertrand* bestimmt und auf das ursprüngliche Volumen (535 ccm) umgerechnet. Wir fanden von mit *Fehling*scher Lösung reduzierbaren Verbindungen nach:

Zeit	Probe A g	Probe B g	Probe C g
Nach 0h	3,5	—	3,5
„ 1 15′	0,6	0	—
„ 2 15	—	—	0
„ 5	0	0	—

Der Zucker verschwindet also sehr bald aus der Versuchsflüssigkeit.

3. *Weiterhin wurde der Alkoholgehalt bestimmt:* 125 ccm der gut geschüttelten Hefesuspension wurden über Kieselgur filtriert. 100 ccm des klaren Filtrats wurden destilliert (eventuell mit Wasserdampf). Das Destillat betrug 50 bis 75 ccm und gelangte in den Proben A und B direkt zur Alkoholbestimmung; in der Probe C erst nach zehnfacher Verdünnung.

Die Alkoholbestimmung geschah nach *Philipp Hamills* Modifikation von *Nicloux'* Methode[1]). Die zu untersuchende Lösung soll einen Alkoholgehalt von 0,05 bis 0,1 Proz. besitzen, 5 ccm Destillat (in C nach zehnfacher Verdünnung) wurden in einen Kolben abpipettiert und 2 ccm Kalium-

[1]) *Maurice Nicloux*, Dosage de l'acool dans le chloroform. Bull. de la Soc. Chim. de Paris (3. Serie) **35**, 330, 1906; *Philipp Hamill*, Journ. of Physiol. **39**, 476–484, 1909/10; C. 1910, I, S. 1273.

bichromatlösung (10,78 g pro Liter) wurden zugefügt; ebenso allmählich und unter Kühlung 5 bis 10 ccm reiner Schwefelsäure. Nach Erwärmen 10 bis 15 Minuten in kochendem Wasserbade wurde abgekühlt, mit Wasser verdünnt, 20 ccm Ferrosulfatlösung wurden zugesetzt und der Überschuß an Ferrosulfat mit der Bichromatlösung und Kaliumferricyanid (3 g in 100 ccm) als Indikator (Tüpfelmethode) oder mit Permanganat titriert. Die Ferrosulfatlösung enthielt 17,22 g $FeSO_4 . (NH_4)_2 SO_4 + 6 H_2O$ pro Liter; 5 ccm derselben entsprachen 1 ccm Bichromatlösung, *a* ccm Bichromat entsprechen *a*/2 Promille Alkohol in der Flüssigkeit.

In dieser Weise fanden wir in den drei Proben folgende Alkoholmengen:

Zeit	Probe A g	Probe B g	Probe C g
Nach 9h	—	—	1,6
„ 17	0,04	0,02	1,5

Der Sauerstoffstrom reißt in der Probe A keinen Alkohol in die Vorlagen mit, denn eine Bestimmung in dieser gab ein negatives Resultat.

4. *Bestimmung der mit etwa 3proz. Salzsäure hydrolysierbaren Kohlehydrate.* Um zu konstatieren, ob durch Assimilation von Zucker oder Alkohol sich in der Hefe neue Kohlehydrate während des Versuches gebildet hatten, wurden in den drei Proben und in 10 g der ursprünglichen Hefe Bestimmungen der mit 3proz. Salzsäure hydrolysierbaren Kohlehydrate vorgenommen.

95 ccm der gut durchgeschüttelten und gleichmäßigen Hefesuspensionen bzw. 10 g Hefe und Wasser (= Totalvolumen 95 ccm) wurden in vier 100-ccm-Meßkolben eingebracht und mit 6 ccm konzentrierter Salzsäure versetzt. Nach dreistündigem Erhitzen im Wasserbade wurde klar filtriert und von den Filtraten je 50 ccm in 100-ccm-Meßkolben abpipettiert. Nach Neutralisation mit n/1 Lauge wurde auf 100 ccm aufgefüllt und in den Lösungen Bertrandbestimmungen ausgeführt. Als Glucose berechnet und auf 535 ccm bezogen, bekamen wir folgende Mengen leicht hydrolysierbarer Kohlehydrate:

Nach 17stündiger Versuchszeit in	Probe A	4,0 g
	„ B	3,7 „
	„ C	4,4 „
	der ursprünglichen Hefe =	4,3 „

5. *Flüchtige Säuren.* Wegen der reichlichen Sauerstoffzufuhr wäre es zu erwarten, daß in der Probe A ein Teil des Zuckers zu organischen Säuren oxydiert würde. Nach dem Versuche wurden deshalb 100 ccm Filtrat der Versuchslösung mit 4 bis 5 ccm Phosphorsäure versetzt und mit Wasserdampf destilliert. Die Vorlageflüssigkeit verbrauchte nur 0,90 ccm n/10 Lauge bei der Neutralisation (Phenophthalein); in 535 ccm also 5 ccm, die als Essigsäure berechnet 0,03 g dieser Säure bedeuten.

6. *Kohlenstoffbilanz.* Wenn wir darüber klar werden wollen, was aus dem zugesetzten Zucker geworden ist, d. h. in welche Verbindungen er umgewandelt worden ist, und seine prozentuale Verteilung auf diese Verbindungen, so geschieht dies am besten dadurch, daß wir die Kohlenstoffgehalte der entstandenen Produkte dem Kohlenstoffgehalt des Zuckers gegenüberstellen.

Tabelle Ia.

Kohlenstoffbilanz des zugesetzten Zuckers und der aus ihm gebildeten Produkte nach einer Versuchszeit von 17 Stunden. Probe A: 3,5 g Dextrose mit Sauerstoffschüttelung. Probe C: 3,5 g Dextrose ohne Sauerstoffschüttelung.

	Probe A	Probe C
Dextrose	0 g = 0 g C	0 g = 0 g C
Kohlensäure	3,6 g = 0,99 g C	= 0,42 g C
Alkohol	0,04 g = 0,02 g C	1,5 g = 0,83 g C
Flüchtige Säuren	0,03 g = 0,01 g C	
Manko	0,38 g C	= 0,15 g C
Dextrose zugesetzt	3,5 g = 1,40 g C	3,5 g = 1,40 g C

Nach der Gärungsformel

$$\underbrace{C_6H_{12}O_6}_{72\,g\,C} = \underbrace{2\,CO_2}_{24\,g\,C} + \underbrace{2\,C_2H_5OH}_{48\,g\,C}$$

verteilt sich der Kohlenstoffgehalt der Dextrose bei der Vergärung so, daß 33,3 Proz. von derselben Kohlensäure und 66,7 Proz. Alkohol bilden. In der Probe C ist nur eine Alkoholbestimmung vorgenommen worden, aber aus dem erhaltenen Werte ist die Kohlensäure nach obiger Gärungsformel berechnet worden.

Tabelle Ib.

Von dem Kohlenstoffgehalt des zugesetzten Zuckers sind in Form von:

	Probe A Proz.	Probe C Proz.	Nach der Gärungsformel berechnet Proz.
Kohlensäure	70,8	29,5	33,3
Alkohol	1,4	59,0	66,7
Flüchtige Säuren	0,7	—	—
Manko	27,1	11,5	—
	100,0	100,0	100,0

Wir finden also besonders in der Probe A große Abweichungen von dem theoretischen Gärungsverlauf. *Fast kein Alkohol und mehr als doppelt so viel Kohlensäure als erwartet werden gebildet (in A): Dazu kommt auch ein großes Manko von 27 Proz.*

Wenn wir die Resultate der Untersuchung über die leicht hydrolisierbaren Kohlehydrate der Hefe betrachten, finden wir, daß auch die Hefetrockensubstanz Veränderungen unterlegen ist. Die Proben A und B, die eine intensive Sauerstoffbehandlung erfahren haben, zeigen einen kleineren Gehalt an diesen Substanzen. In B ist der ursprünglichen Hefe gegenüber eine Abnahme von $\left(\frac{4,3 - 3,7}{4,3}\right) 100 = 14$ Proz. eingetreten, was sich durch die Selbstgärung, die von dem durchgeleiteten Sauerstoffstrom beschleunigt wurde, und die einen Abbau und eine Veratmung der betreffenden Kohlehydrate mit sich brachte, erklären läßt. In A ist die Selbstgärung weniger stark (7 Proz. von

den Kohlehydraten sind verschwunden), vielleicht deshalb, weil eine teilweise Assimilation des Zuckers oder des zugesetzten Alkohols von der Hefe die veratmeten Kohlehydrate zum Teil ersetzt hat.

In der sauerstoffgeschüttelten Probe A ist fast gar kein Alkohol vorhanden, aber dafür desto mehr Kohlensäure. Falls a) hier in einem früheren Stadium der Gärung etwa der theoretische Gehalt an Alkohol vorhanden war, so müßte der Alkohol *direkt* oder über b) *Zwischenprodukte, z. B. Glykogen* zu Kohlensäure und Wasser veratmet (oxydiert) worden sein. Es wäre aber auch möglich, daß c) *der Zucker direkt zu Kohlensäure und Wasser oxydiert würde*, oder endlich erst d) *nach einer Assimilation und Aufbau zu den oben genannten Kohlehydraten*. Eine alkoholische Gärung würde dann nicht eintreten. e) Schließlich ist denkbar, daß sich eine Kombination von allen diesen Möglichkeiten abspielt.

Man könnte auch meinen, daß außer den aufgezählten Verbindungen auch andere entstehen, die einen Teil des Zuckerkohlenstoffs engagieren. Nach den Ergebnissen der folgenden Untersuchungen ist dies aber nicht zutreffend.

Versuch 2.

Parallelversuch zu Versuch 1.

Dieser Versuch ist dem vorigen vollständig ähnlich, nur fehlt die Probe C. Außerdem sind hier pro 535 ccm Totalvolumen 5,0 g Dextrose statt 3,5 g in dem Versuche 1 zugesetzt worden. 100 ccm Versuchslösung enthielten also 0,93 g Dextrose.

Die entsprechende Kohlenstoffbilanz hatte nach 10,40stündiger Versuchszeit folgendes Aussehen:

Tabelle II.

Kohlenstoffbilanz des zugesetzten Zuckers und der aus ihm gebildeten Produkte. Probe A: 50 g Preßhefe und 500 ccm Dextroselösung, enthaltend 5 g Dextrose, wurden 10,40 Stunden im Sauerstoff geschüttelt.

	Probe A		Nach der Gärungsformel berechnet Proz.
Dextrose	0 g = 0 g C		
Kohlensäure	3,5 g = 0,95 g C	47,5 Proz.	33,3
Alkohol	0,15 g = 0,08 g C	4,0 „	66,7
Manko	0,97 g C	48,5 „	—
Dextrose zugesetzt	5,0 g = 2,00 g C	100,0 Proz.	100,0

Wir finden hier dieselben Erscheinungen wie im vorigen Versuch. Der Alkoholgehalt ist etwas größer, 4 gegen 1,4 Proz. Die Kohlensäuremenge ist bedeutend kleiner, aber dafür ist das Manko entsprechend größer. Falls durch Assimilation Kohlehydrat entstanden ist, sind die entstandenen Kohlehydratquantitäten fast doppelt so groß, weil sie nicht so stark veratmet worden sind.

Versuch 8.

Relation von Alkohol, Kohlensäure und Kohlehydratneubildung zum Verschwinden des Zuckers.

A. Hauptprobe. 50 g Preßhefe und 500 ccm Dextroselösung, enthaltend 10 g Dextrose = 535 ccm Totalvolumen, wurden im Sauerstoffstrom geschüttelt. Wir trachteten, hier den Versuch in dem Moment, als der Zucker gerade verschwunden war, abzubrechen.

100 ccm der Versuchsflüssigkeit enthielten 1,87 g Dextrose.

Versuchszeit 9 Stunden.

Versuchstemperatur 12 bis 14° C.

Reaktion der Versuchsflüssigkeit vor dem Versuche neutral, nach dem Versuche sauer.

Trockensubstanz der Hefe 26,5 Proz. ihres Gewichtes.

1. In den Barytvorlagen wurde nach dem Versuche die *Kohlensäure* (auf 535 ccm) zu 5,0 g bestimmt. Da sich in der Probe B während derselben Zeit 1,0 g bildete, so kommen auf Rechnung des Zuckers in A 4,0 g Kohlensäure. *Der Alkoholgehalt* wurde wie im Versuche 1 zu **2,8 g** bestimmt (535 ccm).

Eine herausgenommene und untersuchte Probe ergab, daß nach 4 Stunden noch 4,0 g Dextrose in der Versuchsflüssigkeit vorhanden waren. Nach 9 Stunden konnten keine reduzierenden Verbindungen mehr nachgewiesen werden (auch nicht in der Probe C).

2. *Trockensubstanz.* Unmittelbar nach dem Versuche wurden 250 ccm von der gut durchgeschüttelten Suspension in einer Porzellanschale auf dem Wasserbade eingedampft, der Rückstand pulverisiert und bei 105° zur Gewichtskonstanz getrocknet. Auf das ursprünglichen Versuchsvolumen, 535 ccm, umgerechnet, konnten **15,3 g** Trockensubstanz ermittelt werden.

3. *Fett und andere ätherlösliche Substanzen.* Um nachzuweisen, ob eine Bildung von *Fett* und anderen ätherlöslichen Verbindungen eingetreten war, wurden 8 g der Trockensubstanz 7 Stunden in einem Soxhletapparat mit Äther extrahiert.

Pro 15,3 g Trockensubstanz **0,16 g** Fett.

4. *Acetaldehyd.* Eines der Reaktionsprodukte, die hier in Betracht kommen könnten, wäre Acetaldehyd. Wenn diese Substanz gebildet werden würde, müßte sie wegen ihrer Leichtflüchtigkeit zum Teil in den Barytvorlagen zu finden sein. Nachdem diese titriert waren, wurden sie vereinigt und mit Schwefelsäure bis zu schwach alkalischer Reaktion neutralisiert. Nachdem sich das Bariumsulfat abgesetzt hatte, wurde die überstehende Lösung vorsichtig filtriert und von dem Filtrat 1000 ccm in dem Milchsäurebestimmungsapparat von *Fürth* und *Charnass*[1]) $^3/_4$ Stunden destilliert. In der Vorlage befanden sich 250 ccm Wasser und 20 ccm Kaliumbisulfitlösung (5 g im Liter). Die Titration mit n/10 Jodlösung ergab, daß kein Aldehyd nachgewiesen werden konnte.

5. *Alkoholextraktion des Trockenrückstandes der klar filtrierten und eingedampften Versuchsflüssigkeit.* 200 ccm Suspension wurden über Kieselgur klar filtriert und von den Filtraten 150 ccm in einem Glaskolben auf dem Wasserbade eingedampft. Der Rückstand wurde mit 300 bis 400 ccm 90proz. Alkohol während 2 Stunden extrahiert (Rückflußkühler). Nach der Extraktion bleibt von dem Trockenrückstande nur eine weiße Salzkruste. Diese wurde abfiltriert, der Alkohol verdampft und der Alkohol-

---

[1]) *O. Fürth* und *D. Charnass*, diese Zeitschr. **26**, 199, 1910.

extrakt bei 105° 2 Stunden getrocknet und dann nachgewogen. Pro 535 ccm Versuchsflüssigkeit wurden 0,7 g alkohollöslicher Substanzen gefunden. Da wir in der Probe B unten 0,30 g fanden, so ist also eine Bildung von **0,4 g** in der Hauptprobe konstatiert worden. Das Ergebnis ist also, daß nur unbedeutende Mengen diffusibler Verbindungen gebildet werden.

B. Blindprobe. 50 g Preßhefe und 500 ccm destillierten Wassers = 535 ccm Totalvolumen wurden genau so wie die Hauptprobe behandelt. Die während des Versuches gebildete Kohlensäure betrug **1,0 g** (in 535 ccm). Die Trockensubstanzmenge der Hefesuspension wurde wie in A bestimmt. Sie betrug **12,0 g**.

Der Fettgehalt der totalen Trockensubstanz **0,11 g**.

Die diffusiblen Verbindungen (Alkoholextraktion) machten **0,30 g** aus.

C. Gewöhnliche Gärungsprobe. 50 g Preßhefe und 500 ccm Dextrose, enthaltend 10 g Dextrose = 535 ccm Totalvolumen, wurden in einem Kolben zwecks Verteilung der Hefe durchgeschüttelt und dann unverschlossen neben den übrigen Proben während der ganzen Versuchszeit stehengelassen. Alle 2 oder 3 Stunden wurde kräftig durchgeschüttelt.

100 ccm Versuchslösung enthielten 1,87 g Dextrose.

Nach 9 Stunden war die Versuchsflüssigkeit zuckerfrei.

Alkoholgehalt	**3,9 g**
Trockensubstanzgehalt	**14,5 g**
Fettgehalt	**0,14 g**

D. Blindprobe der Probe C. 50 g Preßhefe und 500 ccm destillierten Wassers = 535 ccm Totalvolumen wurden genau so wie die Probe C behandelt.

Trockensubstanzgehalt	**13,0 g**
Fettgehalt	**0,13 g**

E. Trockensubstanzbestimmungen der Hefe. 50 g Hefe wurden auf dem Wasserbade eingedampft und nachher bei 105° getrocknet, **13,3 g**.

Gegenüberstellung der ermittelten Trockensubstanzmengen.

Probe	A	15,3 g	Substanz
,,	B	12,0 g	,,
,,	C	14,5 g	,,
,,	D	13,0 g	,,
,,	E	13,3 g	,,

Alle Proben enthielten 50 g Preßhefe; A und C außerdem 10 g Dextrose, A und B waren Sauerstoffproben, C und D gewöhnliche Gärungsproben, wo der Luftsauerstoff Zutritt hatte. E repräsentiert die ursprüngliche Hefe.

In D ist eine kleine Selbstgärung oder richtiger Veratmung (denn kein Alkohol wird gebildet) der veratmungsbaren Kohlehydrate der Hefe eingetreten. In B ist dieses Phänomen stärker ausgeprägt wegen der intensiven Sauerstofflüftung. In A und C ist gegenüber den entsprechenden Blindproben eine Trockensubstanzvermehrung von 3,3 bzw. 1,5 g eingetreten, die offenbar auf eine Assimilation von Zucker oder dessen Umwandlungsprodukte zurückzuführen ist. In Prozenten von der Trockensubstanz der Probe E beträgt die Zunahme in A $\frac{3,3}{13,3} \cdot 100 =$ **25** Proz. und in C 11 Proz. *Die Assimilation wird durch*

Sauerstoffzufuhr stark in günstigem Sinne beeinflußt. Wie wir unten auf S. 330 sehen werden, bestehen die Assimilationsprodukte aus höheren Kohlehydraten, teils von leicht und teils von schwer hydrolysierbarem Charakter. Unter den ersteren ist Glykogen ein Hauptbestandteil.

Außer Alkohol, Assimilationsprodukten vom Charakter der höheren Kohlehydrate und Kohlensäure werden keine anderen Verbindungen, die in nennenswerter Menge auftreten, unter unseren Versuchsbedingungen gebildet (vgl. die untenstehende Bilanztabelle IIIa).

Flüchtige Säuren (Versuch 1), nicht flüchtige Säuren (s. unten S. 333), diffusible Verbindungen (in 90proz. alkohollösliche, die Säuren sind hier enthalten), gasförmige Substanzen (s. *Fürth* und *Lieben*), Fett und andere ätherlösliche Substanzen, Acetaldehyd werden nur in unbedeutenden Quantitäten gebildet. Die nicht flüchtigen von diesen Substanzen erhalten wir mit in der Trockensubstanz bei deren Bestimmung.

Wir können also die Assimilationsprodukte mit der Formel ($C_6H_{10}O_5$) und einen Kohlenstoffgehalt von 44,4 Proz. vorläufig in Rechnung stellen.

Bezüglich des Fettes siehe Teil II, S. 349.

Acetaldehyd, den wir vermißt haben, pflegt sonst als Nebenprodukt der Gärung aufzutreten, insbesondere wenn während der Gärung für eine reichliche Sauerstoffzufuhr gesorgt worden ist.

Äthylalkohol wird dann sehr leicht in statu nascendi zu Acetaldehyd oxydiert (besonders bei hautbildenden Hefevegetationen). Nach *Reymann* und *Kruis* erzeugte Brennereihefe unter diesen Umständen besonders viel Aldehyd.

Gegenüberstellung der ermittelten Fettmengen.

Probe A	0,16 g	Fett
„ B	0,11 g	„
„ C	0,14 g	„
„ D	0,13 g	„

Die Fettmengen sind also sehr klein. In A, wo wir den größten Gehalt finden, nur 1,2 Proz. von der Hefetrockensubstanz. Der Fettgehalt scheint denselben Schwankungen wie der Trockensubstanzgehalt in den verschiedenen Proben zu unterliegen.

Tabelle IIIa.

Kohlenstoffbilanz des in den Proben A und C zugesetzten Zuckers und aus demselben gebildeter Produkte. Probe A: Sauerstoffschüttelung, Dextrosezusatz. Probe C: Dextrosegärung ohne Sauerstoffzufuhr. Der Versuch ist in dem Moment, als der Zucker verschwand, unterbrochen worden. Versuchszeit 9 Stunden.

	Probe A	Probe C
Dextrose	0 g = 0 g C	0 g = 0 g C
Alkohol	2,3 g = 1,20 g C	3,9 g = 2,03 g C
Trockensubstanzzunahme berechnet als $C_6H_{10}O_5$	3,3 g = 1,45 g C	1,5 g = 0,67 g C
Kohlensäure	4,0 g = 1,10 g C	4,0 g = 1,05 g C
Manko	0,25 g C	0,25 g C
Dextrose zugesetzt	10,0 g = 4,00 g C	10,0 g = 4,00 g C

In der Probe C ist keine Kohlensäurebestimmung gemacht worden, aber wir haben dasselbe Manko wie in A angenommen und die Kohlensäure durch die Differenzberechnung erhalten.

Tabelle IIIb.

Von dem Kohlenstoffgehalt des zugesetzten Zuckers sind in Form von:

	Probe A Proz.		Probe C Proz.		Nach der Gärungsformel berechnet Proz.
Alkohol	30	66,3	50,7	67,4	66,7
Kohlehydraten $C_6H_{10}O_5$	36,3		16,7		—
Kohlensäure	27,5	33,7	26,4	32,5	33,3
Manko	6,2		6,2		—
	100,0		100,0		100,0

Wenn wir die Tabelle IIIb betrachten, finden wir in A ein Manko von 6,2 Proz. und in C haben wir dasselbe angenommen. In Übereinstimmung damit, was wir eben auf S. 323 gesagt haben, kann dieses Manko nur oder wenigstens zum größten Teil auf Kohlensäureverluste zurückzuführen sein. Nach unten folgenden Versuchen sind wir wohl berechtigt, die Kohlenstoffgehalte des Mankos und der Kohlensäure zu addieren, und bekommen dann einen der wirklichen Kohlensäurebildung (aus dem Zucker) gut entsprechenden Wert, und wir können dabei konstatieren, *daß die Kohlensäurebildung in den beiden Versuchen dieselbe ist wie in der theoretischen Gärungsformel. Die Kohlensäurebildung scheint demnach davon unabhängig zu sein, daß in A nur 30 Proz., in C 50 Proz. statt (in den beiden Proben) 66,7 Proz. von dem in Form von Dextrose zugesetzten Kohlenstoff als Alkohol wiederzufinden ist. Weiter ist sie von den gebildeten Kohlehydratmengen unabhängig. Wenn wir den Kohlenstoffgehalt des gebildeten Alkohols und den der neu gebildeten Kohlehydrate addieren, bekommen wir gerade den Kohlenstoffgehalt der theoretischen Alkoholmenge nach der Gärungsformel. Dieses alles spricht dafür, daß die Hefe den Zucker vollständig in Alkohol und Kohlensäure spaltet und den gebildeten Alkohol teilweise assimiliert. Diese Assimilation wird durch einen Sauerstoffstrom stark befördert und steht in Übereinstimmung mit der später zu erörternden Tatsache, daß der Hefe zugesetzter Alkohol zu Kohlehydrat zu assimilieren vermag.*

Eine direkte Oxydation des Zuckers oder des Alkohols zu Wasser und Kohlensäure findet offenbar nicht statt.

Eine weitere Stütze für die Annahme, daß die Hefe für die während des Versuches gebildeten Kohlehydrate den entstandenen *Alkohol* und nicht den *Zucker* als Baustein verwendete, finden wir in der großen Bedeutung, die dem Sauerstoff in unseren Versuchen zukam. In der sauerstoffgeschüttelten Probe A hat die Hefe 36,3 Proz. von dem

Kohlenstoffgehalt des Zuckers assimiliert, in der Probe C, wo kein Sauerstoff zugeführt worden ist, nur 16,7 Proz. (dementsprechend ist der Alkoholgehalt in A 30 Proz. und in C 50,7 Proz.). Wenn Zucker, der auf demselben Oxydationsstadium wie die Kohlehydrate $C_6H_{10}O_5$ steht, direkt von der Hefe assimiliert werden würde, wäre keine Sauerstoffzufuhr nötig. Ganz anders aber verhält es sich mit dem Alkohol, der im Vergleich zu den Kohlehydraten einen stark reduzierten Körper darstellt. Um hier eine Oxydation durchzuführen, ist viel Sauerstoff notwendig, und in den sauerstoffgelüfteten Proben findet auch ein bedeutend lebhafterer Kohlehydrataufbau statt. In dem Alkoholversuch (Versuch 4, Teil II) haben wir gefunden, daß in der Probe C wo kein Sauerstoff zugeführt worden ist, keine Alkoholassimilation auftrat, daß also der Alkohol ganz intakt blieb. Nur in der sauerstoffbehandelten Probe A trat eine solche ein.

Hier und in den folgenden Zuckerversuchen findet doch in den nicht sauerstoffbehandelten Proben C eine gewisse Assimilation statt. Dies wäre dadurch zu erklären, daß hier der sich aus dem Zucker bildende Alkohol in statu nascendi sich leichter von der Hefe assimilieren ließe, so daß in den Fällen, wo kein Sauerstoff zugeführt wurde, eine gewisse Alkoholmenge von der Hefe unter Ausnutzung von dem immer in der Versuchsflüssigkeit gelösten Sauerstoff aufgenommen werden könnte. (Die Versuchslösung stand an der Luft und konnte aus dieser O_2 beziehen.) (Wenn die Gärung unter streng anaeroben Verhältnissen ausgeführt wird, so findet man, wie bekannt, fast den theoretischen Alkoholgehalt, weil keine Assimilation des Alkohols aus den eben angeführten Gründen eintreten kann.)

Der Zucker wird also anscheinend unter allen Verhältnissen von der Hefe vollständig (der verschwundenen Zuckermenge entsprechend) in Alkohol und Kohlensäure gespaltet, d. h. die Gärung ist vollständig, und es hat nur den Anschein, als ob dies bei Sauerstoffzutritt nicht der Fall wäre, weil eben ein Teil des gebildeten Alkohols assimiliert wird.

Wenn der Vergärungsgrad nach der Alkoholausbeute berechnet wird, bekommen wir in A

$$\frac{100\,.\,30}{66,7} = 45,0 \text{ Proz.}$$

und in C

$$\frac{100\,.\,50,7}{66,7} = 76,0 \text{ Proz.}$$

der theoretischen Ausbeute bei typischer Gärung = 100 Proz.

Keine direkte Oxydation des Zuckers zu Kohlensäure und Wasser findet statt. Der Abbau und die Verbrennung der durch Assimilation aufgespeicherten leicht hydrolysierbaren Kohlehydrate hat noch nicht

angefangen. Die Versuchsflüssigkeiten enthalten nur einen kleinen Prozentgehalt an Alkohol:

$$\text{in A } \frac{2{,}3 \cdot 100}{535} = 0{,}43 \text{ g und in B } \frac{3{,}9 \cdot 100}{535} = 0{,}73 \text{ g pro } 100 \text{ ccm},$$

welche Mengen keinen Einfluß auf den Glykogenabbau haben können.

Wird aber der Versuch mit Sauerstoffbehandlung über den Zeitpunkt hinaus, wo der Zucker gerade verschwindet, ausgedehnt, so wird der gebildete Alkohol weiter und schließlich (wenn das Aufnahmevermögen der Hefe nicht überschritten wird) vollständig assimiliert und von den dabei gebildeten Produkten die leicht hydrolysierbaren, wenigstens das Glykogen (wie wir in den folgenden Versuchen sehen werden, entstehen nämlich auch schwer hydrolysierbare C-Hydrate bei der Assimilation, die nicht abgebaut und veratmet werden), wieder abgebaut und zu Kohlensäure und Wasser oxydiert oder verbrannt, wodurch die Kohlensäureproduktion weit über den Wert der theoretischen Gärungsformel steigt (s. Versuch 1 und 2).

Dies geht aus den Versuchen 1 und 2 hervor, wo der entstandene Alkohol fast vollständig assimiliert worden war.

In diesem Versuche haben wir also restlos aufklären können, welche Produkte und in welchen Mengen dieselben aus dem Zucker gebildet wurden.

Versuch 4.

Fraktionierungsversuch beim Verschwinden größerer Zuckermengen mit und ohne Sauerstoffschüttelung.

Versuchsdaten.

A. Hauptprobe. 60 g Preßhefe und 600 ccm Dextroselösung, enthaltend 51 g Dextrose = 642 ccm Totalvolumen, wurden im Sauerstoffstrom 7 Stunden geschüttelt, dann bei gewöhnlicher Temperatur 12 Stunden über Nacht stehengelassen und am nächsten Morgen wieder 2 Stunden mit Sauerstoff geschüttelt. Die Versuchsflüssigkeit enthielt dann keine reduzierenden Verbindungen mehr. 100 ccm der Versuchsflüssigkeit enthielten 7,95 g Dextrose.

Totale Versuchszeit: 21 Stunden.

Versuchstemperatur: 16 bis 20° C.

Reaktion der Versuchsflüssigkeit: vor dem Versuche neutral, nach dem Versuche sauer.

Trockensubstanz der Hefe: 23,7 Proz.

1. *Alkoholgehalt.* Nach dem Versuche wurden 70 ccm der durchgeschüttelten Suspension über Kieselgur filtriert und 55 ccm von dem Filtrat mit 120 ccm Wasser versetzt, neutralisiert und destilliert. Das Destillat betrug genau 100 ccm. In demselben wurde der Alkoholgehalt pyknometrisch ermittelt. In der totalen Suspension befanden sich **19,5 g A.**

2. *Bestimmung der Zahl der Hefezellen.* Je 2 ccm von der während der letzten 2 Versuchsstunden ohne Unterbrechung geschüttelten Suspension wurden in fünf kleine Flaschen mit 30 ccm Wasser und 10 ccm 10proz. Schwefelsäure (um ein Zusammenballen der Hefezellen zu vermeiden)

abpipettiert (Totalvolumen 42 ccm). Nachdem die Flaschen mindestens ½ Stunde in der Schüttelmaschine kräftig geschüttelt waren, wurden die Zellen in *Bürkers* Blutkörperzählkammer gezählt. Der Mittelwert von den sehr gut übereinstimmenden fünf Zählungen war **12,2 Zellen** pro $^1/_{4000}$ cmm.

3. *Mikroskopische Glykogenuntersuchung.* Die mit der *Lugol*schen Jodlösung gefärbten Hefepräparate wurden mikroskopiert. Im Verhältnis zu der ursprünglichen Hefe, Probe E, konnte kaum eine Vermehrung des Glykogens wahrgenommen werden. Die Hefezellen waren aber größer und praller und die Zahl der kleinen Zellen war bedeutend niedriger als in E.

4. *Trockensubstanzbestimmung.* In 300 ccm der gut geschüttelten Suspension wurde die Trockensubstanz wie im vorigen Versuche bestimmt. Auf 642 ccm **20,8 g.**

5. *Organische Säuren.* 20 ccm Hefefiltrat wurden von 50,4 ccm n/10 NaOH (Phenolphthalein) neutralisiert. Pro 642 ccm also 173 ccm Lauge. Als Essigsäure berechnet, entspricht die gefundene Acidität einer Menge dieser Säure von **1,04 g.**

6. *Chemische Glykogenuntersuchung.* 100 ccm Suspension wurden zu 50 ccm auf dem Wasserbade eingedampft und dann mit 95 g festem KOH versetzt und auf 100 ccm aufgefüllt (60proz. KOH). Nach dreistündigem Erwärmen auf dem Wasserbade wurde abgekühlt, verdünnt und mit Alkohol nach *Pflüger* gefällt[1]). Pro 642 ccm Versuchslösung **4,8 g** Glykogen $C_6H_{10}O_5$.

7. *Bestimmung der mit 2,7proz. Salzsäure hydrolysierbaren Kohlehydrate.* Die Bestimmung wurde so ausgeführt, wie im Versuche 1 beschrieben worden ist. Pro 642 ccm Suspension wurden, als $C_6H_{10}O_5$ berechnet, **6,2 g** „leicht hydrolysierbare“ Kohlehydrate gefunden. Die Hydrolyse war vollständig, denn wenn das Unhydrolysierte auf dem Filter noch einmal hydrolysiert wird, wurden keine reduzierenden Verbindungen mehr gebildet (Teil II, Versuch 1). (Glykogen wird von 2,2proz. und Stärke von 2,7proz. Salzsäure hydrolysiert.)

8. *Bestimmung des Gesamtproteins.* In der getrockneten, pulverisierten und gemischten Hefe (von der Trockensubstanzbestimmung) wurde der Gesamtstickstoff nach *Kjeldahl* ermittelt. Er betrug **1055 mg N.** Gesamtprotein demnach **6,60 g.**

9. *Aschebestimmung.* In der getrockneten, pulverisierten und gemischten Hefe (von der Trockensubstanzbestimmung) wurde der Aschegehalt durch Veraschung von 1,60 g Substanz ermittelt. Pro 642 ccm Suspension **1,1 g.**

10. *Der Fettgehalt* wurde nicht bestimmt, aber auf Grund der im Versuche 3 und 5 erhaltenen Resultate wurde er zu **0,2 g** geschätzt.

B. Blindprobe. 60 g Preßhefe und 600 ccm destillierten Wassers = 642 ccm Totalvolumen wurden so wie die Hauptprobe behandelt.

Reaktion der Versuchsflüssigkeit neutral.

---

[1]) Abderhaldens Biochem. Handlex. 2, 258, 259.

Alle untenstehenden Bestimmungen wurden so wie in der Hauptprobe ausgeführt.

1. *Zahl der Hefezellen* . . . . 12,0 pro $^1/_{4000}$ cmm
2. *Trockensubstanzgehalt* . . . . 18,6 g
3. *Mit 2,7 proz. Salzsäure hydrolysierbare C-Hydrate* . . . . 2,4 g
4. *Gesamtprotein* . . . . 6,60 g
5. *Asche* . . . . 1,1 g
6. *Fett* . . . . 0,2 g

C. Gewöhnliche Gärungsprobe. 60 g Preßhefe und 600 ccm Dextroselösung, enthaltend 51 g Dextrose = 642 ccm Totalvolumen, wurden in einem Kolben zwecks Verteilung der Hefe durchgeschüttelt und ohne Verschluß neben den übrigen Proben während der ganzen Versuchszeit stehengelassen. Alle 2 oder 3 Stunden wurde kräftig geschüttelt. 100 ccm der Versuchslösung enthielten **7,95 g** Dextrose.

Nach der Versuchszeit, 21 Stunden, war die Suspension zuckerfrei. Reaktion der Versuchsflüssigkeit vor dem Versuche neutral, nach dem Versuche sauer.

Alle untenstehenden Bestimmungen wurden so wie in der Hauptprobe ausgeführt.

1. *Alkoholgehalt* . . . . 20,0 g
2. *Zahl der Hefezellen* . . . . 12,0 pro $^1/_{4000}$ cmm
3. *Die mikroskopische Glykogenuntersuchung* gab dasselbe Resultat wie die Hauptprobe A.
4. *Trockensubstanzgehalt* . . . . 21,0 g
5. *Organische Säuren*, pro 642 ccm Suspension 144 ccm n/10 Lauge, als Essigsäure . . 0,87 g
6. *Chemische Glykogenuntersuchung* $C_6H_{10}O_5$. 5,8 g
7. *Mit 2,7 proz. Salzsäure hydrolysierbare C-Hydrate* als $C_6H_{10}O_5$. . . . . 6,8 g
8. *Gesamtprotein* . . . . 6,60 g
9. *Asche* . . . . 1,1 g
10. *Fett* . . . . 0,2 g

D. Blindprobe der Probe C. 60 g Preßhefe und 600 ccm destillierten Wassers = 642 ccm Totalvolumen wurden so wie die Probe C behandelt. Reaktion neutral.

1. *Trockensubstanz*. . . . . 14,0 g
2. *Hydrolysierbare C-Hydrate* $C_6H_{10}O_5$. . . . 2,4 ? g
3. *Gesamtprotein* . . . . 6,6 g
4. *Asche* . . . . 1,1 g
5. *Fett* . . . . 0,2 g

E. Untersuchung der ursprünglichen Hefe. 60 g Preßhefe und 600 ccm destillierten Wassers = 642 ccm Totalvolumen wurden ½ Stunde in einer geschlossenen Flasche in der Schüttelmaschine geschüttelt.

1. *Zahl der Hefezellen* . . . . 11,8 pro $^1/_{4000}$ cmm
2. *Mikroskopische Glykogenuntersuchung*, siehe Hauptprobe A.
3. *Trockensubstanz*. . . . . 14,2 g
4. *Leicht hydrolysierbare C-Hydrate* $C_6H_{10}O_5$. 3,1 g
5. *Gesamtprotein* . . . . 6,6 g
6. *Asche* . . . . 1,1 g
7. *Fett* . . . . 0,2 g

Gegenüberstellung der ermittelten Trockensubstanzmengen.

Probe	A	20,8 g	Zunahme in A = 7,2 g
,,	B	13,6 g	
,,	C	21,0 g	Zunahme in B = 7,0 g
,,	D	14,0 g	
,,	E	14,2 g	

In Prozenten von der Trockensubstanz in der Probe E beträgt die Zunahme in A **51 Proz.** und in C **49 Proz.**

Je nach der Lüftungsintensität zeigen die Proben B und D eine verschieden starke Atmung (vgl. Versuch 3, S. 322).

Diskussion der Versuchsresultate.

a) Gegenüberstellung der Zellenanzahl in den verschiedenen Proben:

Die Zahl der Zellen wird in der Probe A mit 12,2 repräsentiert.
,, ,, ,, ,, ,, ,, ,, ,, B ,, 12,0 ,,
,, ,, ,, ,, ,, ,, ,, ,, C ,, 12,0 ,,
,, ,, ,, ,, ,, ,, ,, ,, E ,, 11,3 ,,

Wir konstatierten zunächst, daß alle Proben, die eine Versuchszeit von 21 Stunden mitmachten, nach dem Versuche dieselbe Zellenzahl aufweisen. Weder Zuckerzusatz, noch Lüftung übten einen Einfluß auf die *Sproßtätigkeit der Hefe* aus. Gegenüber der Probe E zeigen die genannten Proben eine Zellenvermehrung von 6 Proz., und dieselbe dürfte wahrscheinlich von solchen Zellen, die im Anfang des Versuches gerade im Begriffe zu sprossen waren, stammen. In A und C ist aber doch eine *Zunahme von 50 Proz. der Hefetrockensubstanz* eingetreten. Wenn *keine geeignete Stickstoffnahrung zur Verfügung steht und wenn dabei auch Kohlenstoff reichlich vorhanden ist, kann also keine Zellenvermehrung eintreten.* Ganz stickstofffrei ist die die Zellen umgebende Flüssigkeit nicht, denn teils enthält sie eine geringe Menge Würzebestandteile, die bei der Fabrikation der Preßhefe nicht entfernt werden konnten, und teils diffundieren in den Zellen befindliche diffusible Stickstoffverbindungen in die Flüssigkeit hinaus. Diese Substanzen sind die einzigen, welche Stickstoff für das Plasma der neugebildeten Zellen liefern können.

Sonst könnte man glauben, daß die stickstoffreichen alten Zellen einen starken Abbau ihrer eigenen Stickstoffverbindungen durchführen würden. Die Abbauprodukte würden in die umgebende Flüssigkeit hinausdiffundieren und aus derselben von den neuen Zellen aufgenommen und aufgebaut werden. In dieser Weise würde dann eine Vermehrung eintreten können mit Verteilung des Stickstoffs auf die totale Zellenzahl. Jede Zelle müßte dann nach dem Versuche eine kleinere absolute Stickstoffmenge als vor demselben enthalten. Diese Erscheinung scheint aber auch nicht in geringem Maße einzutreten, denn, wenn dies der Fall gewesen wäre, so hätten wir unbedingt eine Einwirkung des Zuckers und des Sauerstoffs nachweisen können. In

den Versuchen 1 und 2, Teil II, S. 352 und 353 werden wir auch sehen, daß sich die Stickstoffsubstanzen in den verschiedenen Proben kaum verändert haben. Der Alkoholgehalt der Versuchsflüssigkeiten A und C ist nur 3,1 g pro 100 ccm, der eine Sprossung noch nicht wesentlich hemmt. Die hohe Hefekonzentration kann dagegen, wenigstens in den nicht mit Sauerstoff behandelten Proben, hinderlich für die Sprossung sein (s. S. 313).

Die große Hefesubstanzzunahme ist also fast ausschließlich nur dadurch zu erklären, daß die alten Zellen die gebotenen Kohlenstoffverbindungen zum Teil in sich aufgespeichert haben, ohne sich dabei zu vermehren. Mikroskopisch ist auch wahrzunehmen, daß nach dem Versuche die Zellen der Zuckerproben größer und praller waren als vor demselben. Die Zahl der kleinen Zellen ist auch kleiner geworden.

b) Unten in der Tabelle IV folgt eine Zusammenstellung der Analysenresultate der Trockensubstanz der verschiedenen Proben. Wir finden dort eine Post „nicht hydrolysierbarer Kohlehydrate", in dem Text auch „schwer hydrolysierbare Kohlehydrate" genannt, welche Bezeichnungen nicht ganz zutreffend sind. Die Menge dieser Kohlehydrate ist als Differenz zwischen den *totalen* (die Berechnung der *totalen Kohlehydrate*, s. Tabelle IV a, erfolgte als Differenz: Gesamttrockensubstanz minus Stickstoffsubstanz minus Fett minus Asche) und den mit *3 proz. Salzsäure hydrolysierbaren* und nachher nach *Bertrand* bestimmbaren Kohlehydraten berechnet worden.

Tabelle IV a.

Zusammenstellung der Analysenresultate der Trockensubstanzen der Proben A, B, C, D und E. Die Ziffern geben die verschiedenen Substanzen in Grammen an. Probe A: Sauerstoffschüttelung, Zuckerzusatz. Probe B: Sauerstoffschüttelung ohne Zuckerzusatz. Probe C: Zuckerzusatz ohne Sauerstoffschüttelung. Probe D: Ohne Zucker, ohne Sauerstoffschüttelung. Probe E: Die ursprüngliche Hefe direkt getrocknet.

	Probe A Proz.	Probe B Proz.	Probe C Proz.	Probe D Proz.	Probe E Proz.
1. Stickstoffsubstanz	6,6	6,6	6,6	6,6	6,6
2. Fett	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
3. Kohlehydrate $C_6H_{10}O_5$					
a) Totalgehalt	12,9	5,7	13,1	6,1	6,3
b) Mit 2,7 proz. HCl hydrolysierbare	6,2	2,4	6,3	2,4?	3,1
c) Glykogen: c) ist ein Teil von b)	4,8	—	5,3	—	—
d) Nicht hydrolysierbare a minus b	6,7	3,3	6,8	3,7?	3,2
4. Asche	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1
Totale Trockensubstanzmenge (1 + 2 + 3a + 4)	20,8	13,6	21,0	14,0	14,2

Die Kohlehydrate der Kolonne 3a bestehen aus Glykogen, Pentosan, Hemicellulose, Cellulose, Gummi, Schleimsubstanzen.

Tabelle IVb.

Die prozentuale Verteilung (in der Trockensubstanz) der in der Tabelle IVa angegebenen Substanzen.

	Probe A Proz.	Probe B Proz.	Probe C Proz.	Probe D Proz.	Probe E Proz.
1. Stickstoffsubstanz	31,7	48,5	31,4	47,1	46,5
2. Fett	1,0	1,5	1,0	1,4	1,4
3. Kohlehydrate $C_6H_{10}O_5$					
a) Totalgehalt	62,0	41,9	62,3	43,6	44,3
b) Mit 2,7 proz. HCl hydrolysierbare	29,8	17,6	30,0	17,1?	21,8
c) Glykogen: c) ist ein Teil von b)	23,1	—	25,2	—	—
d) Nicht hydrolysierbare a minus b	32,2	24,3	32,3	26,5?	22,5
4. Asche	5,3	8,1	5,3	7,9	7,8
Totale Trockensubstanzmenge (1 + 2 + 3a + 4)	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0

Tabelle IVc.

Die prozentuale Zusammensetzung der Kohlehydrate der Trockensubstanz. Die Werte sind aus der Tabelle IVa berechnet.

	Probe A Proz.	Probe B Proz.	Probe C Proz.	Probe D Proz.	Probe E Proz.
1. a) Mit 2,7 proz. HCl hydrolysierbare Kohlehydrate $C_6H_{10}O_5$	48,0	42,1	48,1	39,4?	49,2
b) Glykogen: In Prozenten von 1a + 2 = Totale C-Hydrate	37,2	—	40,5	—	—
In Proz. von 1a = hydrolysierbare Kohlehydrate	77,5	—	84,0	—	—
2. Nicht hydrolysierbare Kohlehydrate	52,0	57,9	51,9	60,6?	50,8
Summa 1a + 2	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0

c) Kohlehydratbestand.

Wie aus der Tabelle IVa ersichtlich ist, gehen Fett, Stickstoffsubstanz und Asche in allen Proben mit demselben absoluten Wert ein. Nur die absoluten Kohlehydratmengen schwanken in den verschiedenen Proben und bedingen allein die vorhandenen Unterschiede in dieser Tabelle und der Tabelle IVb. In den beiden zuckerbehandelten Proben ist der Kohlehydratgehalt **105 bis 125 Proz.** größer als in den übrigen. Die Proben A und C zeigen eine sehr gute Übereinstimmung, und der Sauerstoff hat also keine bedeutende Veränderungen hervorgerufen. Von den mit Zucker nicht behandelten Proben B, D und E repräsentiert E das Ausgangsmaterial, die ursprüngliche Hefe; die Proben B und D sind einer Selbstgärung unterlegen, was eine Ab-

nahme ihrer Kohlehydratgehalte verursacht hat. Diese Abnahme ist in der sauerstoffgeschüttelten Probe B am größten und beträgt gegenüber der Probe E $\frac{6,3 - 5,7}{6,3}$ = **9,5 Proz.** und ist auf ein Verschwinden von 22,5 Proz. der hydrolysierbaren Kohlehydrate zurückzuführen. In der Probe D erreichen die veratmeten Kohlehydrate einen Betrag von $\frac{6,3 - 6,1}{6,3}$ = 3,2 Proz. von der ursprünglichen vorhandenen Menge.

In den Zuckerproben A und C haben die hydrolysierbaren Kohlehydrate gegenüber den Selbstgärungsproben B und D mit über 150 Proz. und gegenüber E mit 100 Proz. zugenommen, währenddem die nicht hydrolysierbaren eine Zunahme von ungefähr 100 Proz. erfahren haben. Der zugesetzte Zucker hat sich also stärker auf die erstere Kohlehydratgruppe als auf die letztere verteilt.

Wenn wir die Tabelle IVc betrachten, finden wir, daß in der ursprünglichen Hefe 49,2 Proz. von den totalen Kohlehydraten mit 2,7 proz. Salzsäure hydrolysierbar sind und hauptsächlich aus Glykogen bestehen. Bei der Selbstgärung der Hefe B und D werden diese teilweise zu $\frac{3,1 - 2,4}{3,1}$ = 22,5 Proz. oxydiert und veratmet, wodurch das Verhältnis zu den nicht hydrolysierbaren Kohlehydraten, die keiner Oxydation unterliegen und konstant bleiben, verschoben, d. h. verkleinert wird. Bei Zusatz von Zucker, Probe A und C, wird dieser teilweise assimiliert (nach vorheriger Spaltung in Alkohol und Kohlensäure) und zum Aufbau von sowohl hydrolysierbaren wie nicht hydrolysierbaren Kohlehydraten in dem Sinne verwendet, daß das ursprüngliche Verhältnis zwischen den beiden Kohlehydratfraktionen soweit als möglich wiederhergestellt wird.

In A wurden von dem assimilierten Zucker für hydrolysierbare Kohlehydrate 52,8 Proz. und für nicht hydrolysierbare Kohlehydrate 47,2 Proz. in Anspruch genommen. Bei der Probe C sind die entsprechenden Zahlen 55,7 und 44,3 Proz.

Die totalen Kohlehydrate schwanken zwischen 40 und 60 Proz. der Hefetrockensubstanz (Tabelle IVb), wobei sich die größere Zahl auf die Zuckerproben bezieht. Der Glykogengehalt der Hefe beträgt in A 23,1 Proz. und in C 25,2 Proz. der Trockensubstanz.

Wie wir weiter unten auf S. 335 sehen können, ist in diesen Proben ein Abbau und Veratmung des Glykogens noch nicht eingetreten. Der Versuch ist in dem Moment, als der Zucker verschwunden war, abgebrochen worden und die Veratmung des Glykogens setzt erst später ein (S. 336). Dies steht in guter Übereinstimmung mit der Beobachtung, daß die Hefe besonders am Schluß der Hauptgärung sehr beträchtliche Mengen Glykogen enthält.

Die Stickstoffsubstanzen zeigen in den Proben B, D und E (ohne Zucker, Tabelle IVb) einen normalen Wert von ungefähr 50 Proz. von der Trockensubstanz, aber sinken in den Zuckerproben infolge Anreicherung an Kohlehydrat prozentual bis zu 31,4 Proz., ohne daß eine absolute Abnahme erfolgt.

d) Andere stickstofffreie Bestandteile.

Fett. Der Fettgehalt ist sehr klein und beträgt in der ursprünglichen Hefe nur 1,4 Proz. von der Trockensubstanz. In den mit und ohne Zucker behandelten Proben ist kein Aufbau bzw. keine Veratmung von Fett wahrzunehmen. Was in dem Versuche 1, Teil II, von dieser Substanz gesagt wird, gilt auch hier.

Organische Säuren. Organische Säuren sind in A und C in einer absoluten Menge von 1 g (S. 327), als Essigsäure berechnet, gebildet worden. 2 Proz. von der in Form von Dextrose zugesetzten Kohlenstoffmenge sind nach Tabelle Vb als Säuren gebunden worden.

Die Säuren befinden sich in der Versuchsflüssigkeit in großer Verdünnung, 1 g (als Essigsäure) oder rund 0,016 g-Äquivalente pro 640 ccm. Die filtrierten Suspensionen gaben auch mit $PbAc_2$, $CaCl_2$, $CaCl_2$ und NH_3, $BaCl_2$ keine oder höchstens minimale Trübungen. Anorganische Phosphate, Schwefelsäure, Bernsteinsäure, Weinsäure, Oxalsäure, Citronensäure, Äpfelsäure sind also nur in Spuren vorhanden. Bernsteinsäure ist ein ständiges Nebenprodukt der alkoholischen Gärung, wenn auch ihre Menge großen Schwankungen unterliegt; in diesem Versuche ist sie z. B. kaum nachweisbar. Wahrscheinlich dürfte die Hauptmenge der Säuren aus Essigsäure bestehen. Milchsäure kommt nicht in Betracht, denn sie wird unter den hier herrschenden Bedingungen veratmet[1]). Die Essigsäure verflüchtet sich bei der Trockensubstanzbestimmung und ist also nicht in den Kohlehydraten in unserer Tabelle IV enthalten.

Die prozentischen Schwankungen des *Aschengehaltes* zwischen 5 bis 8 Proz. sind ausschließlich auf die Veränderungen des Kohlehydratbestandes zu beziehen.

e) Kohlenstoffbilanz.

Bei den Proben A und C bildeten sich aus dem zugesetzten Zucker und dessen Abbauprodukten Alkohol, Kohlehydrate (die sich in einer Zunahme der Hefetrockensubstanz zeigten), flüchtige Säuren und Kohlensäure. Mit Ausnahme der Kohlensäure kennen wir die quantitativen Mengen und die Kohlenstoffgehalte dieser Stoffe, aber da wir eine bestimmte Menge Zucker zugesetzt haben, können wir, gestützt auf die früheren Versuche durch Differenzberechnung, auch die Kohlensäure schätzen (da andere kohlenstoffhaltige Stoffe hier nicht in merklichen Mengen in Betracht kommen) und erhalten so die folgende Bilanztabelle.

---

[1]) *O. Fürth* und *F. Lieben*, diese Zeitschr. **128**, Heft 1/3, S. 143, 1922; **132**, Heft 1/3, S. 165, 1922.

Tabelle Va.

Kohlenstoffbilanz der Proben A und C. Probe A: Zuckerzusatz und Sauerstoffschüttelung. Probe C: Zuckerzusatz ohne Sauerstoffschüttelung.

	Probe A	Probe C
Alkohol	19,5 g = 10,2 g C	20,0 g = 10,4 g C
Trockensubstanzzunahme berechnet als $C_6H_{10}O_5$ (Differenz A minus B bzw. C minus D)	7,2 g = 3,2 g C	7,0 g = 3,1 g C
Organische Säuren als Essigsäure berechnet	1,0 g = 0,4 g C	0,9 g = 0,4 g C
Kohlensäure (Differenzberechnung	24,2 g = 6,6 g C	23,8 g = 6,5 g C
Dextrose zugesetzt	51,0 g = 20,4 g C	51,0 g = 20,4 g C

Tabelle Vb.

Von dem Kohlenstoffgehalt des zugesetzten Zuckers sind in Form von:

	Probe A Proz. C	Probe C Proz. C	Nach der Gärungsformel berechnet Proz. C
Alkohol	50,1	51,0	66,7
Kohlehydrate $C_6H_{10}O_5$	15,7	15,2	0
Organische Säuren	2,0	2,0	0
Kohlensäure	32,2	31,8	33,3
	100,0	100,0	100,0

In diesem Versuche hat der Sauerstoff scheinbar keinen bemerkenswerten Einfluß ausgeübt, denn die Proben A und C, B und D zeigen kaum einen Unterschied. Die gebildete Kohlensäure tritt in Quantitäten auf, die dem theoretischen Gehalt an dieser Substanz (nach der Gärungsformel) sehr nahe liegen. Dagegen finden sich in Form von Alkohol nur rund 50 Proz. von dem Kohlenstoff des zugesetzten Zuckers, statt 67 Proz. nach der Gärungsformel. Den Rest hat die Hefe für Kohlehydrataufbau und für Bildung einer kleinen Menge organischer Säuren verwendet. Eine direkte Oxydation von Zucker zu Kohlensäure und Wasser hat nicht stattgefunden.

Die Alkoholausbeute betrug in A $\frac{50,1 \, . \, 100}{67,7} = 75$ Proz. der theoretischen. *Giltay* und *Aberson* haben in Übereinstimmung damit bei reichlicher Durchlüftung der Hefe 72 Proz. des zugesetzten Zuckers erhalten.

Wenn wir den Kohlenstoffgehalt des erhaltenen Alkohols und den der neugebildeten Kohlehydrate addieren, bekommen wir gerade den Kohlenstoffgehalt der theoretischen Alkoholmenge nach der Gärungsformel, und wir können daraus schließen, daß keine direkte Oxydation des Zuckers oder des gebildeten Alkohols zu Kohlensäure und Wasser, welche Oxydation

ein Minus dieser Summe mit sich gebracht hätte, erfolgt ist. Der Alkohol verschwindet nur in dem Maße aus der Versuchsflüssigkeit, als er von der Hefe assimiliert wird. Weiter geht hervor, daß Abbau und sekundäre Verbrennung der assimilierten leicht hydrolysierbaren Kohlehydrate noch nicht eingesetzt hat (also genau dieselben Erscheinungen wie im Versuch 3, S. 321).

Natürlich hat aber die Hefe den für sie unbedingt notwendigen Atmungsprozeß während des ganzen Versuches aufrecht erhalten, aber die dabei verbrauchten Stoffe kommen in unseren Tabellen nicht zum Vorschein, weil diese auf die Unterschiede zwischen Proben mit (A und C) und ohne Zucker (B und D), in welchen letzteren die Hefe annähernd dasselbe Atmungsbedürfnis wie in den ersteren hat, aufgebaut sind (wie wir unten sehen werden, ist nämlich keine Vermehrung der Hefe in den Zuckerproben gegenüber den mit Zucker nicht behandelten Proben eingetreten).

Theoretisches über Assimilation und Atmung der Hefe.

Nach der *Glykogenatmungstheorie von Grüss*[1]) wäre Glykogen das *einzige* Atmungsmaterial der Hefe. Der Zucker werde zuerst (durch Zymase oder auf eine andere Weise) in die Atomkomplexe $CH_2OH-CHOH-CHO$ gespalten, welche von dem Plasma aufgenommen, verarbeitet und schließlich als *Glykogen* in Vakuolen deponiert werden. Nur das Glykogen kann *veratmet* oder *vergoren* werden, nachdem es durch ein Enzym, Carbohydrase, in Glykose umgewandelt worden ist, welche schließlich zu Kohlensäure und Wasser unter Aufnahme von Sauerstoff durch eine *Oxydase* veratmet wird oder beim Mangel an Sauerstoff unter Mitwirkung von einer *Hydrogenase* zu Kohlensäure und Alkohol vergoren wird.

Im vorhergehenden Versuche haben wir aber konstatiert (Tabelle IV), daß der assimilierte Zucker nicht nur Glykogen bildet, sondern auch beträchtliche Quantitäten (45 Proz. des Zuckers) von *schwer hydrolysierbaren Kohlehydraten.* Auch die leicht hydrolysierbaren bestehen nicht nur aus Glykogen. Die erstgenannte Kohlehydratgruppe wird (wie aus Tabelle IVa hervorgeht) in der lebenden Zelle *nicht* abgebaut, weder vergoren, noch oxydiert [wohl aber bei der Autolyse[2])], denn die Probe B zeigt trotz der energischen Sauerstoffbehandlung denselben absoluten Gehalt an diesen Kohlehydraten wie die ursprüngliche Hefe (vgl. S. 332).

Aus den gewonnenen Resultaten und davon ausgehend, daß die Gärungsformel bisher unter den bei unseren Versuchen herrschenden

[1]) *J. Grüss*, Zeitschr. f. d. ges. Brauwesen 27, 1904.

[2]) *J. Effront*, Le Moniteur Scientif, S. 485. Quenesville 1905. Bull. Soc. Chim. ser. 3, 33/36, 847, 1905.

Bedingungen gültig ist und da weiter die nächsten Versuche in gleichem Sinne sprachen, können wir uns folgendes Bild von den Vorgängen in der Versuchsflüssigkeit machen: Der zugefügte Zucker wird, abgesehen von einer geringfügigen Bildung organischer Säuren, vollständig im Sinne der Gärungsformel, also zu gleichen Teilen in Alkohol und Kohlensäure gespalten, unabhängig davon, ob die Gärung aerob oder anaerob verläuft. Die Kohlensäure wird aus der Versuchsflüssigkeit entfernt, und diese enthält jetzt von dem in Form von Zucker zugesetzten Kohlenstoff nur mehr so viel, als in dem gebildeten Alkohol (und in den Säuren) vorhanden ist, das sind 66,7 Proz. Der Alkohol wird nicht direkt verbrannt, sondern wird bei O_2-Zutritt zum Teil assimiliert und dabei zu höheren Kohlehydraten aufgebaut, die teils leicht, teils schwer hydrolysierbar sind. Die letzteren entziehen sich auf Grund ihrer Schwerlöslichkeit und Unvergärbarkeit weiteren Zersetzungen bei der Atmung. Im letzten Versuche machten die neugebildeten, schwer hydrolysierbaren Kohlehydrate rund 45 Proz. von dem Totalgehalt der assimilierten Kohlenstoffsubstanzen aus. Diese Assimilation beginnt, sobald sich Alkohol gebildet hat, also lange bevor der Zucker vollständig vergoren ist und setzt sich, solange Alkohol noch vorhanden ist, fort, wenn dabei Sauerstoff für die die Assimilation begleitende Oxydation in geeigneter Form geboten wird.

Die bisherige Annahme besagt, daß bei Gegenwart von O_2 der Zucker teils direkt *veratmet* und teils *vergoren* wird:

$$\text{Zucker} + O = CO_2 + H_2O = \text{Atmung},$$
$$\text{Zucker} = CO_2 + C_2H_5OH = \text{Gärung}.$$

Diese beiden Prozesse sollen also bei Sauerstoffzufuhr nebeneinander laufen. Unter unseren Versuchsbedingungen ist dies aber nicht zutreffend. Neben der Gärung läuft hier statt einer *direkten Oxydation* des Zuckers eine *Assimilation* von aus ihm gebildetem *Alkohol* mit *nachheriger Verbrennung (oder Vergärung) von Teilen der gebildeten Assimilationsprodukte.*

Die *Eiweißstoffe* bleiben, da sich die Hefe während des Versuches nicht vermehrt (S. 329), beinahe ganz intakt (Teil II, Versuch 1 und 2), und wir haben deshalb keinen Grund, anzunehmen, daß ein Teil des Alkohols oder der Kohlehydrate für Eiweißaufbau verwendet wird. Erst nachdem der Zucker verschwunden ist, setzt allmählich ein Abbau der leicht hydrolysierbaren Kohlehydrate, wenigstens des Glykogens (aber nicht der schwer hydrolysierbaren) ein, wobei erstere oder letzteres verzuckert und unter Bildung von Kohlensäure und Wasser oder Kohlensäure und Alkohol oxydiert bzw. vergoren wird. Wenn in dieser Weise der Alkohol bei O_2-Zufuhr vollständig assimiliert worden ist, was die Anwesenheit genügender Hefemengen voraussagt,

und die dabei gebildeten leicht hydrolysierbaren Kohlehydrate vollständig veratmet worden sind, ist der ganze Kohlenstoffgehalt des zugesetzten Zuckers bis auf den Teil, der in den gebildeten nicht hydrolysierbaren Kohlehydraten gebunden ist, ganz in Kohlensäure übergeführt. Die später einsetzende Veratmung des gebildeten Glykogens wird von einem Sauerstoffstrom, solange die zugesetzten Zuckermengen sich unter einer gewissen Grenze halten, stark unterstützt.

Unsere Resultate stehen also nicht im Einklang mit der oben angeführten Glykogengärungstheorie. Es scheint nicht, daß sich die Alkoholgärung *über Glykogen als Zwischenprodukt* vollzieht. Im Gegenteil wird diese Substanz *aus dem bei der Gärung entstandenen Alkohol gebildet* und neben dem Glykogen auch große Mengen anderer, noch höherer Kohlehydrate, die sich nicht wieder abbauen und veratmen lassen.

Wie bekannt, sind auch andere Einwände gegen die Annahme, daß Glykogen ein Zwischenprodukt bei der alkoholischen Gärung von Zuckerarten ist, gemacht worden, z. B. daß in ein und derselben Kultur einzelne Zellen keine, andere sehr deutliche Glykogenreaktion geben, und daß bei manchen Hefearten, die Zucker vergären und veratmen, niemals Glykogen nachgewiesen werden konnte.

Die Analogie zwischen Gärung und Zellatmung hat schon *Pasteur* betont, und nach *O. Meyerhof*[1]) läßt sie sich unter Berücksichtigung der neueren Forschungen verfolgen. *Pasteur* sagt, daß die Bedeutung der Gärung für das Leben der Hefe in der Energie liegt, die durch den Zuckerzerfall frei wird. Das Leben der höheren Pflanzen wird durch die Verbrennung oder Atmung erhalten; bei der Hefe tritt als Ersatz eine verwandte Energiequelle, die Gärung, auf.

In unseren Versuchen erscheint die Gärung als *eine Vorstufe der Atmung*. Durch die Gärung werden nämlich die nächsten Bausteine der Atmungskohlehydrate (sowie die der Kohlehydrate der Zelle) gebildet. Die Atmung hat zur Aufgabe, der Zelle Energie zu liefern, aber bei der Assimilation des durch die Gärung gebildeten Alkohols wird schon ein Drittel des Energiegehaltes der entsprechenden Glucosemenge frei, das die Zellen zum Teil oder vollständig ausnutzen kann. Durch die Verbrennung der aus dem Alkohol gebildeten Assimilationsprodukte erhält die Zelle die restlichen zwei Drittel der Gesamtenergie der Glucose (s. unten S. 339). Die Verbrennung (Atmung) fängt also schon bei der Assimilation des Alkohols, die mit einer Oxydation verbunden ist, an; die Assimilation ist demnach eine *Verbrennungsstufe*. *Euler*[2]) sagt, daß sich die Hefezelle die nötige Energie für die Assimilation

---

[1]) *O. Meyerhof*, Naturwissenschaften 7, 253—259; C. 1919, III, S. 57.

[2]) *Euler* und *Lindner*, Chemie der Hefe und der alkoholischen Gärung, S. 218.

des Zuckers durch eine direkte Verbrennung eines Teiles desselben anschafft. Hier finden wir eine solche Verbrennung nicht begründet, da die Assimilation des gebildeten Alkohols exotherm verläuft.

Die *Atmung* kann unabhängig von der *Gärung* sein, und zwar, wenn die Zelle über genügend *Atmungsmaterial*, *Kohlehydrate hauptsächlich von Glykogencharakter*, verfügt, die zu Kohlensäure und Wasser verbrannt werden (Zucker ist in diesem Falle kein Atmungsmaterial, weil er nicht direkt oxydiert wird). Um diese Kohlehydrate zu bilden, ist aber die Zelle und damit auch die Atmung, wenn Zucker die einzige Kohlenstoffquelle ist, auf die alkoholische Gärung angewiesen, weil nicht Zucker selbst, sondern nur aus demselben gebildeter Alkohol assimiliert werden kann. Unter diesen Umständen ist also die Gärung ein *notwendiger Lebensvorgang*. Wenn kein Sauerstoff vorhanden ist, kann der entstandene Alkohol nicht assimiliert werden, und die Zelle muß sterben, nachdem das zur Verfügung stehende Atmungsmaterial verbraucht oder vergoren worden ist.

Sind aber auch *andere Kohlenstoffverbindungen* vorhanden, die selbst, oder nachdem sie eine geeignete Veränderung durch die Hefe, z. B. bei *Acetessigsäure* (Teil IV) eine Reduktion durch Abspaltung von Kohlensäure erfahren haben, assimiliert werden können, so trägt die alkoholische Gärung zusammen mit diesen C-Verbindungen dazu bei, Atmungsmaterial zu liefern. Befindet sich schließlich gar kein Zucker, wohl aber die erwähnten Kohlenstoffverbindungen, in dem Nährsubstrat, so kann die Zelle von der alkoholischen Gärung vollständig unabhängig gedeihen und normal atmen[1]). Solche Kohlehydrate sind z. B. *die Dextrine*, die nach *Lindner assimiliert*, aber nicht *vergoren* werden können. Auch kann es nach *Klöcker* vorkommen, daß sich eine Hefeart gegenüber einem Zucker ähnlich verhält (vgl. S. 313, und *Fuhrmann*, „Vorlesung über technische Mykologie", S. 359. Jena, Verlag G. Fischer, 1913). Bei den nicht glykogenbildenden Pilzen befinden sich wahrscheinlich andere Kohlenstoffverbindungen im obigen Sinne als Atmungsmaterial, oder können diese Pilze Zucker vielleicht direkt zu Kohlensäure und Wasser verbrennen, um ihren Energiebedarf zu decken.

E. Köhler[2]) macht die Annahme, daß in vielen Fällen der Gärungserreger erst die Spaltprodukte für die Assimilation verwenden könne; dabei muß man sich fragen: „Wie kommt es, daß Spaltprodukte im Überfluß gebildet und nur zum kleinsten Teil vom Organismus ausgenutzt werden?" In obiger Annahme „würde nichts Befremdendes liegen, sobald sich nachweisen ließe, daß die Spaltprodukte für die Ernährung verwendet werden könnten". In den hier beschriebenen Versuchen hat es sich aber gezeigt, daß der gebildete Alkohol zum großen Teil ja sogar vollständig assimiliert werden kann, und wir können deshalb der *Köhler*schen Vorstellung „vom Mechanismus der Gärung" beistimmen: „Die Gärungsfermente bilden das Substrat zu Bausteinen um. Diese Bausteine werden zu Plasmasynthese verwendet."

---

[1]) Vgl. *Th. Bokorny*, Zentralbl. f. Bakt. **50**, 2. Abt., S. 23–33, 10–12; C. 1920, III, S. 54.

[2]) *E. Köhler*, diese Zeitschr. **111**, 17–29, 1920.

„Hat die Zelle für die Bausteine keine Verwendung, und dieser Fall tritt ein, wenn andere für die Synthese erforderlichen Stoffe (auch Fermente) fehlen, so treten diese Stoffe ohne weitere Veränderungen oder nach weiter erfolgtem Abbau als Gärungsprodukte in Freiheit. Für die *Atmung* ist demnach charakteristisch die Zertrümmerung assimilierter Teile, für die *Gärung* Zertrümmerung nicht assimilierter Stoffe."

Die im vorstehenden ausgeführte Vorstellung, derzufolge der Hefezelle zugesetzter Zucker nicht direkt, sondern erst auf dem Umwege des Alkohols vollzogener Assimilation zu Glykogen verbrannt werden kann, bildet eine interessante Analogie zu den Vorstellungen, zu denen in jüngster Zeit *F. Laquer*[1]) in *Embdens* Laboratorium bezüglich des Abbaues der Kohlehydrate gelangt ist. „Die Tatsache", sagt *Laquer*, „daß Traubenzucker und Fruchtzucker im Gegensatz zu Glykogen und Lactacidogen nur unter den günstigeren Bedingungen niederer Temperaturen vom Muskelbrei (Frosch) zu Milchsäure abgebaut werden können, spricht dafür, *daß Traubenzucker im Muskel nicht direkt, sondern erst nach Umwandlung in einer leicht oxydierbaren Form verwertet werden kann.*"

Energiebilanz bei der Assimilation des Zuckers.

1. Direkt, 2. indirekt über Alkohol als Zwischenprodukt.

Im Verhältnis zu der direkten Assimilation des Zuckers,

$$C_6H_{12}O_6 \longrightarrow C_6H_{10}O_5, \qquad (1)$$

bedeutet die indirekte über Alkohol,

$$C_6H_{12}O_6 \longrightarrow C_2H_6O + CO_2 \longrightarrow C_6H_{10}O_5, \qquad (2)$$

einen Materialverlust, denn ein Drittel von dem Kohlenstoffgehalt des Zuckers entweicht als Kohlensäure. Dagegen wird durch diese Abstoßung eines vollständig oxydierten Anteils (Kohlensäure), der Energie nicht mehr liefern kann, zunächst eine Energiekonzentration erreicht, denn das System enthält noch nach der Gärung dieselbe Energiemenge wie vor derselben, bis auf einen kleinen Verlust.

$$C_6H_{12}O_6 = 2\,CO_2 + 2\,C_2H_6O.$$

Da die bei einer Reaktion auftretende Wärmetönung die Differenz ausmacht zwischen dem Energiegehalt des Ausgangsmaterials und demjenigen der Endprodukte, so läßt sich die Gärungswärme berechnen aus der Verbrennungswärme des Zuckers und des Äthylalkohols.

Die Verbrennungswärme der Glykose bei konstantem Druck = 674,0 kg/Cal pro Mol (*Stohmann*); des Äthylalkohols = 326,2 kg/cal pro Mol (*Berthelot-Matignon*; *Atwater-Snell*). CO_2 entweicht als Gas und braucht also nicht in Rechnung gezogen zu werden. Zu diesen Werten kommen noch die Lösungswärme der Glykose, 2,1 kg/cal und des Äthylalkohols, 2,3 kg/cal. Man erhält demnach als Wärmetönung des alkoholischen Zuckerzerfalls (674,0 + 2,1) − 2 . (326,25 − 2,25) = 28,1 kg/cal pro Mol, 1,2 bis

[1]) *F. Laquer*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **122**, 26, 1922.

1,5 Proz. des Zuckers werden von der Hefe assimiliert; 3 Proz. bilden Glycerin, ein kleiner Teil wird direkt veratmet zu CO_2. Wir korrigieren mit höchstens 5 Proz. des oben berechneten Wertes und erhalten 27 kg/cal pro Mol Glykose. *Rubner* berechnet 24 kg/cal und findet dieselben vollständig bei der Gärung in Form von freier, kalorimetrisch bestimmbarer Wärme wieder[1]).

Die Kondensation von 1 Mol Dextrose zu einer $C_6H_{10}O_5$-Gruppe (Glykogen) verläuft unter Aufnahme von 4,9 kg/cal (674 + 4,9 = 678,9 kg/cal). [*Stohmann*[2]) hat die Verbrennungswärme von 1 g Glykogen zu 4191 cal bestimmt; hieraus läßt sich die Verbrennungswärme von einer $C_6H_{10}O_5$-Gruppe, 162 g, zu 678,9 kg/cal berechnen]. Die Reaktion bedeutet, da Wasser abgestoßen wird, wieder eine Energiekonzentration.

Wenn sich dagegen 3 Mol Alkohol unter Aufnahme von Sauerstoff zu Glykogen (und Wasser) nach der Formel

$$3\,C_2H_6O + 6\,O = C_6H_{10}O_5 + 4\,H_2O$$

kondensieren, wird eine große Energiemenge frei, die, wenn sie nicht in Form von Wärme auftritt, die durch eine Temperatursteigerung kalorimetrisch gemessen werden kann, der Hefe zugute kommt.

Die Verbrennungswärme von 3 Mol Alkohol ist 3 . 326,2 = 978,6 kg/Cal.

Die Verbrennungswärme von 1 $C_6H_{10}O_5$-Gruppe ist 678,9 kg/Cal.

Bei der Alkoholassimilation werden demnach 978,6 — 678,9 = 299,7 kg/Cal frei, die, wenn sie nicht in Wärme umgewandelt werden, der Hefe als Energiequelle dienen können, wodurch die Zelle von ihren eigenen Energievorräten weniger in Anspruch zu nehmen braucht.

Wenn die Assimilation nach der obigen Gleichung 2 verläuft, können wegen der abgestoßenen Kohlensäure höchstens nur zwei Drittel von der nach der Gleichung 1 möglichen Menge an Kohlehydraten $C_6H_{10}O_5$ gebildet werden. Dafür wird dagegen fast ein Drittel von der nach 1. aufgespeicherten Energiemenge bei der Assimilation frei.

Energiebilanz nach der Gleichung:

1. 3 Mol Dextrose werden *direkt von der Hefe zu Glykogen assimiliert und nachher veratmet.*

$$\overbrace{\underbrace{3\,C_6H_{12}O_6}_{(3\,.\,674{,}0\,\text{Cal})} \longrightarrow \underbrace{3\,C_6H_{10}O_5}_{(3\,.\,678{,}9\,\text{Cal})} + 3\,H_2O - 14{,}7\,\text{kg/Cal}}^{\textit{Assimilation}}$$

$$\textit{Atmung}\ \Big\{\downarrow + 36\,O$$

$$\overbrace{18\,CO_2 + 18\,H_2O + 3\,.\,678{,}9\ (= 2036{,}7)\,\text{kg/Cal},}$$

Stadium a) = Assimilation . — 14,7 Cal

„ b) = Veratmung . + 2036,7 „

+ 2022,0 Cal werden der Hefe geboten.

Bei der direkten Assimilation des Zuckers zu Glykogen wird eine kleine Energiemenge gebunden. Bei der vollständigen Veratmung des gebildeten Glykogens zu Kohlensäure und Wasser entstehen 2036,7 kg/Cal.

---

[1]) Siehe *Euler* und *Lindner*, Chemie der Hefe und der alkoholischen Gärung, S. 246.

[2]) Vgl. *O. Meyerhof*, diese Zeitschr. **129**, 604, 1922.

2. 3 Mol Glykose werden von der Hefe *vollständig zu Kohlensäure und Alkohol vergoren.* Bei Sauerstoffzufuhr wird der *gebildete Alkohol quantitativ zu Glykogen assimiliert und nachher veratmet.*

$$\overbrace{\underbrace{3\ C_6H_{12}O_6}_{(3\,.\,674{,}0)} \longrightarrow 6\ CO_2 + 6\,.\,\underbrace{C_2H_6O}_{(6\,.\,326{,}2)} + 64{,}8\ \text{kg/Cal}}^{\textit{Gärung}}$$

$$+\ 12\,O \downarrow \Big\}\ \textit{Assimilation}$$

$$\overbrace{2\ C_6H_{10}O_5 + 8\ H_2O +}\ \left\{\begin{array}{l} +\ 6\,.\,326{,}2 = 1957{,}2 \\ -\ 2\,.\,678{,}9 = 1357{,}8 \\ \hline \quad +\ 599{,}4\ \text{Cal} \end{array}\right.$$

$$+\ 24\,O \downarrow \Big\}\ \textit{Atmung}$$

$$\overbrace{12\ CO_2 + 10\ H_2O + 1357{,}8\ \text{Cal.}}$$

Stadium a)	= Gärung . . .	+	64,8 Cal
,, b)	= Assimilation .	+	599,4 ,,
,, c)	= Veratmung .	+	1357,8 ,,
		+	2022,0 Cal werden der Hefe geboten.

Bei der Assimilation des Zuckers über Alkohol als Zwischenprodukt finden wir zwei Drittel dei Zuckerkohlenstoffmenge als Assimilationsprodukt, und ein Drittel der Energiemenge des Zuckers wird frei. Bei der Assimilation und Atmung entstehen 2022,0 Cal. In 1. werden bei der Veratmung des direkt aus dem Zucker assimilierten Glykogens 2036,7 Cal frei, aber dafür hat die Hefe für diese Assimilation den Mehrbetrag 2036,7 − 2022,0 = 14,7 Cal verwenden müssen.

Anmerkung. Da der Alkohol dem Glykogen gegenüber ein stark reduziertes Produkt bedeutet, können die Betrachtungen *Rubners*[1]) bezüglich der Wärmetönung bei dem Übergang von Zucker in Glykogen in der Hefe hier keine Anwendung finden.

Die bei der Assimilation des gebildeten Alkohols entwickelte Energiemenge kann zum Teil oder vollständig von der Hefe ausgenutzt werden.

Mit Hilfe mikrokalorimetrischer Methoden zeigte *Rubner*[2]) bei Hefen, daß diese nur Wärme entwickeln, wenn sie sich in Zuckerlösungen befinden. Es entsteht dabei nur so viel Wärme, als auf Grund von thermochemischen Berechnungen der Gärungsgleichung erwartet werden kann.

Die bei einer Assimilation von Teilen des durch die Gärung gebildeten Alkohols frei gewordene Energiemenge tritt also nicht in Form von kalorimetrisch bestimmbarer Wärme auf, sondern scheint vollständig von der Hefe ausgenutzt zu werden (vgl. Teil II, S. 363, und Teil III.

---

[1]) *M. Rubner,* Sitzungsber. d. kgl. Preuß. Akad. d. Wiss. Berlin 1913; C. 1913, I, S. 1217.

[2]) *M. Rubner,* Sitzungsber. d. kgl. Preuß.Akad. d, Wiss. Berlin 1912, S. 124—133.

Über den Einfluß des Sauerstoffs auf die assimilatorische und dissimilatorische Tätigkeit der Hefe.

II. Teil.

Weitere Untersuchungen über das Verhalten von Monosacchariden.

Von

Harry Lundin.

(Aus der chemischen Abteilung des Wiener physiologischen Universitätsinstituts.)

(Eingegangen am 16. Juli 1923.)

Mit 5 Abbildungen im Text

Inhaltsverzeichnis.

In einer früheren Mitteilung haben wir versucht, uns darüber klar zu werden, welchen Einfluß reichliche Sauerstoffzufuhr, wie sie die Schüttelung einer Hefesuspension bei Durchleitung eines Sauerstoffstromes bewirkt, auf die assimilatorische und dissimilatorische Tätigkeit der Hefe ausübt. Dabei wurde insbesondere Alkohol- und Kohlensäurebildung, Kohlehydratbestand, Trockensubstanz, Hefezählung und Kohlenstoffbilanz in Rechnung gezogen und eine Energiebilanz bei der Assimilation von Zucker auf dem Wege über Alkohol aufgestellt.

In der folgenden Untersuchung haben wir uns bemüht, den Kreis unserer Erfahrungen dadurch zu erweitern, daß wir die Hefe auf einen großen Zuckerüberschuß bei Sauerstoffschüttelung einwirken ließen und neben der Kohlenstoffbilanz auch die Stickstoffbilanz eingehend in Betracht zogen, schließlich unsere Versuche außer auf Dextrose auch auf Lävulose und Galaktose erstreckten.

Wir sind so dazu gelangt, einerseits unsere Einsichten über die Assimilation des aus dem Zucker gebildeten Alkohols schärfer zu formulieren, andererseits konnten wir uns über die Relation zwischen den leicht und schwer hydrolysierbaren Kohlehydraten bei der Assimilation und Dissimilation der Hefe bestimmte Vorstellungen bilden.

Versuch 1.

Dextrose. Weiteres über Kohlehydrat- und Fettneubildung, Stickstoffverteilung.

Versuchsdaten.

A. Hauptprobe. 80 g Preßhefe + 600 ccm Dextroselösung, enthaltend 80 g Dextrose = 665 ccm Totalvolumen, wurden 7 Stunden im Sauerstoffstrom geschüttelt, dann 14 Stunden über Nacht stehengelassen und am nächsten Tage noch 8 Stunden geschüttelt. Die Versuchslösung enthielt dann keine reduzierenden Verbindungen mehr.

100 ccm der Versuchsflüssigkeiten enthielten 12,0 g Dextrose.

Totale Versuchszeit 29 Stunden.

Versuchstemperatur 16 bis 20° C.

Reaktion der Versuchsflüssigkeit vor dem Versuche neutral, nach dem Versuche sauer.

Trockensubstanzgehalt der Hefe 25,4 Proz.

Nach 21 Stunden enthielt die Suspension noch 17 g Dextrose, nach 29 Stunden aber keine reduzierenden Verbindungen mehr. Nach dem Versuche wurden folgende Bestimmungen ausgeführt. Die Zahlen beziehen sich auf das totale ursprüngliche Flüssigkeitsvolumen 665 ccm (vgl. Versuch 4, Teil I).

1. *Alkoholgehalt*, pyknometrisch bestimmt, 30,3 g.

2. *Trockensubstanzgehalt* 32,1 g. (Die erhaltene Trockensubstanz wurde für die folgenden Untersuchungen benutzt.)

3. *Cellulose-(Rohfaser-)Gehalt* wurde durch Behandlung von 3 g der oben erhaltenen Trockensubstanz mit 60proz. Kalilauge in der Wärme ermittelt[1]). Rohfaser 0,8 g.

[1]) Nach *Pflüger*, s. Abderhaldens Biochem. Arbeitsmeth. 3, 280.

4. *Glykogenbestimmung.* Das alkalische glykogenhaltige Filtrat von den abfiltrierten Rohfasern bei der Cellulosebestimmung wurde verdünnt und das Glykogen mit Alkohol ausgefällt (s. Versuch 4, Teil I, S. 327). Glykogen als $C_6H_{10}O_5$ 9,1 g.

5. *Organische Säuren.* Auf Grund des vorigen Versuches 4 wurden die organischen Säuren, als Essigsäure berechnet, zu 1,0 g geschätzt.

6. *Fett und andere ätherlösliche Substanzen.* 4 g Trockensubstanz wurden 6 Stunden nach *Soxhlet* extrahiert, 0,25 g.

7. *Bestimmung der mit 3proz. Salzsäure hydrolysierbaren Kohlehydrate.* Die wie oben ätherextrahierte Substanz wurde in einen 100-ccm-Meßkolben quantitativ eingefüllt und dort mit 6 ccm konzentrierter Salzsäure und mit Wasser bis zur Marke versetzt. Nach dreistündiger Hydrolyse im kochenden Wasserbade wurde das verdunstete Wasser ergänzt und filtriert. In dem neutralisierten Filtrat konnten als $C_6H_{10}O_5$ 12,1 g Kohlehydrate bestimmt werden. Die auf dem Filter zurückbleibende, nicht hydrolysierte Substanz wurde mit warmem Wasser gewaschen, bis das Wasser klar und farblos ablief und keine Chlorreaktion gab, und dann in einen 100-ccm-Meßkolben quantitativ heruntergespült. Nach Zusatz von 6 ccm konzentrierter Salzsäure und Wasser bis zur Marke wurde wieder 3 Stunden auf dem Wasserbade hydrolysiert. Nachher Auffüllung und Filtrierung. Das Filtrat enthielt keine reduzierenden Verbindungen.

Mit 3proz. Salzsäure werden also alle von dieser Säure hydrolysierbaren Verbindungen innerhalb 3 Stunden bei 100° C *vollständig hydrolysiert.*

Das auf dem Filter nach der letztgenannten Filtration Zurückbleibende wurde mit warmem Wasser ausgewaschen, getrocknet, gewogen und sodann kjeldahlisiert. Wenn wir von dem Totalgewicht das aus der Stickstoffanalyse berechnete Protein abziehen, bekommen wir also die von 3proz. Salzsäure (während 6 Stunden) nicht angreifbaren Kohlehydrate (das Fett war schon wegextrahiert und die Asche wurde bei den Salzsäurebehandlungen auch entfernt). Dieselben betrugen in 665 ccm Suspension 3,40 g.

8. Nach der Tabelle Ia ist aber der totale Kohlehydratgehalt der Probe A 21,5 g. Von diesen haben wir 12,1 g als mit 3proz. Salzsäure hydrolysierbare und nach *Bertrand* bestimmbare Kohlehydrate identifizieren können und 3,40 g als von dieser Säure nicht hydrolysierbare. Bleibt also ein Rest von 21,5 − (12,1 + 3,40) = 6,0 g Kohlehydrat. Dieser Rest muß während der Salzsäurebehandlung zwar in Lösung gegangen. jedoch in Verbindungen umgewandelt worden sein, die eine alkalische Kupferlösung nicht reduzieren.

Um zu kontrollieren, ob diese Verbindungen bei einer stärkeren Hydrolyse der mit 3proz. Salzsäure erhaltenen Hydrolyseprodukte ihre Gegenwart durch eine Zunahme der nach *Bertrand* bestimmbaren Verbindungen verrät, wurde das neutralisierte, übrig gebliebene Filtrat nach der Glykosebestimmung (s. oben) mit rauchender Bromwasserstoffsäure (spezifisches Gewicht 1,49; auf 80 ccm neutralisierten Filtrats 25 ccm dieser Säure) versetzt und 2,5 Stunden mit Rückflußkühler auf dem Sandbade langsam gekocht[1]). Bromwasserstoffsäure wird, um eine Oxydation zu vermeiden, statt Salzsäure verwendet. Nach der Hydrolyse war die abgetrennte Flüssigkeit ziemlich stark dunkel gefärbt und trübe (humifizierte Kohlehydrate, Melanine!). Nach Neutralisation wurde eine Bertrandbestimmung ausgeführt, die statt mindestens 13,4 g Glykose nur 8,8 g gab. Durch

[1]) *Neuberg* und *Hymann*, Hofmeisters Beitr. z. Physiol. u. Pathol. 2, 206.

Humifikation haben sich also mindestens 4,6 g Glykose der Bertrandbestimmung entzogen.

Während des Eindampfens bei der Trockensubstanzbestimmung ist es denkbar, daß Glykogen zu Glykose eventuell hydrolysiert werden könnte, und daß wir oben also nur einen Teil der „leicht" hydrolysierbaren Kohlehydrate bestimmt haben. 2 g Trockensubstanz wurden deshalb mit lauwarmem Wasser 2 Stunden geschüttelt; nachher filtriert und in dem Filtrat die Zuckerbestimmung ausgeführt. Dieselbe war negativ. Bei der Eindampfung und Trocknung sind also keine wesentlichen Veränderungen eingetreten.

9. *Gehalt an Stickstoff* 1,410 g.

Gehalt an Gesamtprotein 8,8 g.

10. *Gehalt an Formolstickstoff.* 5,00 g Trockensubstanz wurden mit Wasser in einem 100-ccm-Meßkolben 20 Minuten in kochendem Wasserbade gewärmt. Hierbei gehen lösliche Verbindungen in Lösung; die koagulierbaren Eiweißstoffe der Hefesuspension sind bei der Eindampfung derselben bei der Trockensubstanzbestimmung auskoaguliert worden. Nach Abkühlung wurde mit Wasser zur Marke aufgefüllt. Über Nacht setzte sich das Unlösliche auf dem Boden ab, und die überstehende Lösung konnte abpipettiert werden und durch Faltenfilter filtriert werden. 40 ccm Filtrat wurden in einen Meßkolben, 50 ccm fassend, abpipettiert, 1 g kristallisiertes Bariumchlorid und 0,3 ccm Phenolphthaleinlösung dazugegeben. Nachdem sich das Bariumchlorid gelöst hatte, wurde eine gesättigte Barytlösung bis zur Rotfärbung zugesetzt und außerdem noch 3 ccm; Auffüllung mit Wasser zur Marke; Filtration nach 20 Minuten; 40 ccm von dem Filtrat wurden mit n/5 Salzsäure neutralisiert (Azolithminpapier) und 10 ccm neutralisierter Formollösung zugesetzt. Nachher Titrierung mit n/10 Natriumhydrat bis zur deutlichen Rotfärbung. (Die nachfolgenden Proben B, C, D und E wurden gleichzeitig titriert, so daß wir in allen Proben dieselbe Farbentiefe erhielten.) In 665 ccm Suspension 0,050 g Formolstickstoff.

11. *Wasserunlösliche bzw. koagulierbare Eiweißstoffe.* Das, was bei der Behandlung mit Wasser nicht in Lösung gegangen war, wurde durch dasselbe Filter, das für die Filtration der abpipettierten Wasserextrakte diente, quantitativ abfiltriert und mit heißem Wasser so lange gewaschen, daß dasselbe farblos ablief. Das (durch das Waschwasser nicht verdünnte) Filtrat gab eine *negative Hellersche Probe.* Es sind also keine Albumosen vorhanden. *Die Biuretreaktion fiel auch negativ aus.* Keine Peptone. Der ausgewaschene unlösliche Rückstand wurde kjeldahlisiert. Pro 665 ccm Versuchslösung 0,990 g N. (An sich wasserunlösliche und koagulierbare Eiweißstoffe.)

12. *Aschegehalt* 1,5 g.

B. Blindprobe. 80 g Preßhefe und 600 ccm destilliertes Wasser = 665 ccm Totalvolumen wurden so wie die Hauptprobe behandelt.

C. Gewöhnliche Gärungsprobe. 80 g Preßhefe und 600 ccm Dextroselösung, enthaltend 80 g Dextrose = 665 ccm Totalvolumen, wurden in einem Kolben durchgeschüttelt und dann unverschlossen neben den übrigen Proben während der ganzen Versuchszeit stehengelassen. Alle 2 oder 3 Stunden wurde kräftig durchgeschüttelt. 100 ccm der Versuchslösung enthielten 12,0 g Dextrose.

Nach der Versuchszeit, 29 Stunden, war die Suspension zuckerfrei.

D. Blindprobe der Probe C. 80 g Preßhefe und 600 ccm destilliertes Wasser = 665 ccm Totalvolumen wurden so wie C behandelt.

E. Untersuchung der ursprünglichen Hefe. 80 g Preßhefe wurden auf dem Wasserbade eingedampft und nachher bei 105° getrocknet.

Diskussion der Versuchsresultate.

a) Trockensubstanz und Kohlehydratbestand.

Probe A . . 32,1 g
„ B . . 19,7 g
„ C . . 31,7 g (vgl. Versuch 3 und 4, Teil I, S. 322 und 329).
„ D . . 20,2 g
„ E . . 20,3 g

Das, was wir in den Versuchen mit „schwer“ bzw. „nicht hydrolysierbaren Kohlehydraten“ bezeichnen, ist die Differenz zwischen den gesamten Kohlehydraten und den mit 3proz. Salzsäure hydrolysierbaren und nachher nach *Bertrand* bestimmbaren Kohlehydraten. Diese Differenzkohlehydrate werden aber zum Teil von 3proz. Salzsäure in Lösung gebracht, aber geben dabei keine reduzierbaren Verbindungen und können deshalb nicht mit den „hydrolysierbaren“ Substanzen mitbestimmt werden.

Die „hydrolysierbaren“ Kohlehydrate umfassen also nicht alle in Salzsäure löslichen, sondern nur den Teil derselben, der reduzierbare Verbindungen abspaltet.

Es scheint, daß diese „nicht hydrolysierbaren Kohlehydrate“ von der Hefe nicht abgebaut und veratmet werden, denn sie erfahren niemals eine Abnahme, nicht einmal in den nicht zuckerbehandelten Blindproben (vgl. die Tabelle I, Teil I, S. 335).

Tabelle Ia.

Zusammenstellung der Analysenresultate der Trockensubstanzen der Proben A, B, C, D und E. Die Ziffern geben die verschiedenen Substanzen in Grammen an. Probe A: Sauerstoffschüttelung und Zuckerzusatz. Probe B: Sauerstoffschüttelung ohne Zuckerzusatz. Probe C: Zuckerzusatz ohne Sauerstoffschüttelung. Probe D: Ohne Zuckerzusatz, ohne Sauerstoffschüttelung. Probe E: Die ursprüngliche Hefe direkt getrocknet.

Probe:	A	B	C	D	E
1. Stickstoffsubstanzen	8,8	8,8	8,8	8,8	8,8
2. Fett	0,3	0,2	0,5	0,3	0,3
3. Kohlehydrate $C_6H_{10}O_5$					
a) Totalgehalt	21,5	9,2	20,9	9,6	9,7
b) „Hydrolysierbare“ (3proz. HCl)	12,1	4,6	11,5	4,7?	5,1
c) Glykogen, c ist ein Teil von b	9,1	—	—	—	—
d) „Nicht hydrolysierbare“ (3proz. HCl) = a — b	9,4	4,6	9,4	4,9?	4,6
e) Rohfaser, e ist ein Teil von d	0,8	—	—	—	—
4. Asche	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
Totale Trockensubstanzmenge (1 + 2 + 3a + 4)	32,1	19,7	31,7	20,2	20,3

Die Kohlehydrate der Reihe 3a bestehen aus Glykogen, Pentosan, Hemicellulose, Cellulose, Gummi, Schleimsubstanzen.

Die Kohlehydrate der Reihe 3d bestehen aus 1. von 3proz. HCl nicht angreifbarem Kohleydrat (Rohfaser usw.), in A = 3,4 g, in B = 2,7 g, 2. werden von 3proz. HCl zwar in Lösung gebracht, liefern jedoch keine reduzierenden Produkte, in A = 6,0 g, in B = 1,9 g.

Tabelle Ib.

Die prozentuale Verteilung der in der Tabelle Ia angegebenen Substanzen.

Probe:	A Proz.	B Proz.	C Proz.	D Proz.	E Proz.
1.	27,4	44,7	27,7	43,5	43,3
2.	0,9	1,0	1,6	1,5	1,5
3. a)	67,0	46,7	66,0	47,5	47,8
b)	37,7	23,4	36,3	23,3?	25,1
c)	28,4	—	—	—	—
d)	29,3	23,3	29,7	24,2?	22,7
e)	2,5	—	—	—	—
4.	4,7	7,6	4,7	7,5	7,4
Summa (1 + 2 + 3a + 4)	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0

1. Von 3proz. HCl absolut nicht hydrolysierbare Kohlehydrate (Rohfaser):

$$\text{in A } \frac{3{,}4 \cdot 100}{32{,}1} = 10{,}6 \text{ Proz.}$$

$$\text{in B } \frac{2{,}7 \cdot 100}{19{,}7} = 13{,}7 \text{ Proz.}$$

2. Von 3proz. HCl zwar in Lösung gebracht, jedoch ohne reduzierende Produkte zu liefern:

$$\text{in A } \frac{6{,}0 \cdot 100}{32{,}1} = 18{,}7 \text{ Proz.}$$

$$\text{in B } \frac{1{,}9 \cdot 100}{19{,}7} = 9{,}6 \text{ Proz.}$$

Tabelle Ic.

Die prozentuale Zusammensetzung der Kohlehydrate der Trockensubstanz $C_6H_{10}O_5$.

Probe:	A Proz.	B Proz.	C Proz.	D Proz.	E Proz.
a) „Hydrolysierbare“	56,3	50,0	55,0	49,0 ?	52,5
b) Glykogen, in Prozenten von: 1a + 2; = Tot. Kohlehydrate	42,3	—	—	—	—
1a; = „hydrolysierbare Kohlehydrate“	75,3	—	—	—	—
„Nicht hydrolysierbare“	43,7	50,0	45,0	51,0 ?	47,4
umma 1a + 2	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0

In diesem Versuche finden wir eine Bestätigung des vorigen Versuches 4, il I. Nur die verschiedenen Mengen an Kohlehydraten bedingen die der Tabelle Ia befindlichen Unterschiede zwischen den Proben. In

den beiden zuckerbehandelten Proben ist der *Gesamtkohlehydratgehalt* 116 bis 134 Proz. größer als in den übrigen. Die Selbstgärung in B und D ist bedeutend geringer als in dem Versuch 4, Teil I. Die vergorenen Substanzen betragen in B gegenüber E $\frac{(9,7 - 9,2) . 100}{9,7}$ = **5,2 Proz.** Die entsprechende Zahl der Probe D ist **1,0 Proz.** (im Versuche 4, Teil I, 9,5 und 3,2 Proz.).

In den Zuckerproben haben die „*hydrolysierbaren*" Kohlehydrate gegenüber den Selbstgärungsproben B und D mit **145** und **165 Proz.** und gegenüber E mit **125** und **140 Proz.** zugenommen, währenddem die „*nicht hydrolysierbaren*" eine Zunahme von ungefähr **100 Proz.** erfahren haben. Also dieselbe Erscheinung wie im Versuche 4, Teil I.

Die ursprüngliche Hefe besaß 52,6 Proz. von den gesamten Kohlehydraten in „hydrolysierbarer" Form, hauptsächlich Glykogen, wovon bei der Selbstgärung in B und D gegenüber Versuch 4 relativ wenig veratmet wurde; $\frac{(5,1 - 4,6) . 100}{5,1}$ = 9,8 Proz. in B (gegen 22,5 Proz. in Versuch 4). Hierdurch verändert sich der Prozentgehalt der „hydrolysierbaren" Kohlehydrate in derselben Probe von 52,6 zu 50,0 Proz.

In A wurde von dem assimilierten Zucker
für „hydrolysierbare" Kohlehydrate . . . . 61 Proz.
„ „nicht hydrolysierbare" Kohlehydrate . . 39 „
in Anspruch genommen.

Bei der Probe C finden wir die entsprechenden Werte **60,2** und **39,8 Proz.**

In der Probe A verteilte sich der als Kohlehydrat assimilierte Alkohol folgendermaßen:

	Probe: A	B	C-Hydrate aus dem Alkohol
1. Leicht hydrolysierbare Kohlehydrate	12,1	— 4,6	= 7,5 g
2. Durch HCl in Lösung gebrachte Kohlehydrate, die keine reduzierbare Spaltprodukte geben . .	5,0	— 1,9	= 4,1 g
3. Unangreifbare Kohlehydrate	3,4	— 2,7	= 0,7 g
			12,3 g

Die Fraktion 1 hat also die weitaus stärkste Zunahme erfahren und die Fraktion 3 die kleinste. Eine Cellulosebildung findet nicht statt. Gegenüber der ursprünglichen Hefe (Probe E, Fraktion 1 = 5,1; Fraktion 2 = 1,9; Fraktion 3 = 2,7) ist die prozentuale Vermehrung für Fraktion 1 = **147 Proz.**, für 2 = **215 Proz.** und für 3 = **26 Proz.**; und also in 2 am stärksten.

Der für die Synthese notwendiger Zellbestandteile des Plasmas verwendete Alkohol steht also nicht in konstanter Beziehung zum Gesamtzuwachs der Hefe[1]) (Zellenvermehrung 6 Proz. und Trockensubstanzvermehrung 37 Proz. in der Probe A, vgl. Teil I, S. 314, und unten S. 363).

[1]) Die Fraktion 1 ist scharf begrenzt, denn wenn die Hydrolyse mit 3proz. Salzsäure fortgesetzt wird, erfahren diese Kohlehydrate keine weitere Zunahme (S. 344). Ob dasselbe für die beiden anderen Fraktionen gilt, ist nicht konstatiert worden. Bei einer fortgesetzten Hydrolyse könnte eventuell Fraktion 2 auf Kosten von Fraktion 3 zunehmen.

Die Stickstoffsubstanzen betragen in B, D und E (alle ohne Zuckerzusatz) 43 bis 45 Proz., sinken aber in den Zuckerproben A und C zu dem niedrigen Werte 27,5 Proz. Über die nähere Zusammensetzung dieser Stoffe s. unten S. 352.

b) Fettbildung.

Eine Fettbildung in der Hefezelle vollzieht sich nur in Gegenwart von Sauerstoff. Da aber der Zucker gegenüber Fett ein stark oxydierter Körper ist, ist es unwahrscheinlich, daß derselbe als nächstes Ausgangsmaterial für die Fettbildung dienen kann. Dagegen ist Alkohol stärker reduziert als Fett[1]), wodurch die Notwendigkeit des Sauerstoffs bei einer Bildung von Fett aus dieser Substanz erklärlich wird.

Literaturangaben über die Fettbildung in der Hefezelle.

Lindner[2]) bezeichnet den Alkohol als Grundsubstanz für Fett. Fettbildende Hefearten ziehen Alkohol lebhaft an und synthetisieren ihn in Gegenwart von Sauerstoff zu Fett. *Je kärglicher die N-Nahrung ist,* desto *langsamer wird die Sprossung* und desto *stärker die Verfettung.* Alkohol ist ausgezeichnet geeignet zur Bildung von Fett in der Hefe und kann ein wichtiger Baustein für die Zelle werden[3]). *Lindner*[4]) fand, daß Preßhefe bei reichlichem Luftzutritt Alkohol unter Bildung von Fett assimiliert; am besten in mineralischer Nährlösung mit karger Stickstoffquelle. *Bokorny*[5]) konnte dagegen nur eine schwache Fettbildung, 1,3 bis 2,5 Proz., in der Preßhefe beobachten, währenddem andere Verfasser 20 Proz. angeben. Die Unstimmigkeiten sind wohl auf die kurze Versuchsdauer (3 Tage) zurückzuführen. Nach *Lindner*[6]) besitzt man in dem Fernhalten des Sauerstoffs ein Mittel, die Fettbildung zu verhindern und die Zellen gesund und sproßtüchtig zu erhalten. Nach den neueren Untersuchungen von *Zikes*[7]) ist die Bildung von Fett bei tieferen Temperaturen, 12 bis 15°,

---

[1]) Stearinsäure, $C_{18}(H_2O)_2H_{32}$, auf 1 C 1,78 H
Glycerin, $C_3(H_2O)_3H_2$, auf 1 C 0,67 H (nach Abrechnung
Alkohol, $C_2H_4(H_2O)$, auf 1 C 2,00 H des Wassers)
Dextrose, $C_2(H_2O)_6$, auf 1 C 0,00 H

[2]) *P. Lindner*, Zeitschr. f. techn. Biol. **9**, 100—107; C. 1921, III, S. 961.

[3]) *Derselbe*, Ber. d. deutsch. Bot. Ges. **37**, Generalvers.-Heft 34/40; 1920, III, S. 802.

[4]) *Derselbe*, Zeitschr. f. techn. Biol. **7**, 68—78, 1919; C. 1920, I, S. 430.

[5]) *Th. Bokorny*, diese Zeitschr. **75**, 346—375, 1916.

[6]) *P. Lindner*, Zeitschr. f. Biol. **7**, 68—78, 1919; C. 1920, I, S. 430.

[7]) *H. Zikes*, Zentralbl. f. Bakt. **49**, 16—17. „Die vergleichende Untersuchung des Glykogen-, Volutin- und Fettgehaltes ergab, daß der Glykogengehalt in der Regel rascher ansteigt, dafür aber rascher fällt als der Volutingehalt. Die Zu- und Abnahme des Glykogen- und Volutingehaltes ist bei den verschiedenen Pilzen von äußeren Umständen abhängig und an eine gewisse Zeitspanne gebunden. Der Fettgehalt nimmt gegenüber den gesamten Reservestoffen langsam zu und bleibt selbst in sehr alten Zellen erhalten, ja überdauert oft den ganzen übrigen Inhalt der Zelle. Eine kräftige N-Nahrung beeinflußt in günstigem Sinne die Bildung aller drei Körper, am meisten die des Volutins." Zentralbl. f. Bakt. **57**, 1—3, 1921/22.

sehr langsam, rascher bei 20 bis 30°. Freie Zufuhr von Sauerstoff und ein an Kohlehydraten reicher *stickstofffreier Nährboden* führen zu vermehrter Bildung von Fett in der Hefe[1]). *Neuberg*[2]) hat das Problem über die Entstehung höherer Fettsäuren aus Zucker in Angriff genommen. Er brachte den experimentellen Beweis dafür, daß Acetaldehyd als Umsetzungsprodukt in Beziehungen zu den Vorgängen der wahren saccharogenen Buttersäurebildung steht. Bei der Fettbildung aus Zucker konnte nach *Haen*[3]) Acetaldehyd als Zwischenprodukt nachgewiesen werden. Auf etwa nebenher verlaufender alkoholischer Gärung dürfte sein Auftreten nicht beruhen, da Alkohol nicht nachgewiesen werden konnte[4]).

Der Umstand, daß in unseren Versuchen keine N-Nahrung, keine Sprossung, reichliche Versorgung mit Sauerstoff und reichliche C-Nahrung (Alkohol) vorhanden waren, würde zur Annahme berechtigen, daß eine starke Fettbildung eintreten würde. Daß dies nicht der Fall war, muß der kurzen Versuchsdauer, weniger als 30 Stunden, und der relativ niedrigen Temperatur, im allgemeinen 16 bis 17°, zugeschrieben werden.

Wir haben zwar das Fett nur durch direkte Ätherextraktion der Hefetrockensubstanz bestimmt.

Wie *Naegeli* zuerst beobachtete, soll man aber, nach Zerstörung der Zellwände mit konzentrierter Salzsäure, zwei- bis dreimal mehr Fett erhalten können. Nach *I. Smedley*[5]) ist ein großer Teil des unter normalen Verhältnissen in der Hefe vorhandenen Fettes und des damit verknüpften Sterins in irgend einer Weise an das Protoplasma gebunden und wird daraus durch Behandlung mit Alkohol und Äther nicht ausgezogen. Dieser Komplex wird durch Kochen mit verdünnten Mineralsäuren zerlegt, so daß das Fett mit Äther ausgezogen werden kann.

Um uns zu überzeugen, ob derart gebundenes Fett in der Hefe zu finden wäre, wurden 4 g Trockensubstanz in einer Porzellanschale mit Wasser verrührt. Nach Zusatz von 3 ccm H_2SO_4, 50 Proz. Na_2SO_4 und Quarzsand wurde am Wasserbade zur Trockne gebracht und der Rückstand 9 Stunden mit entwässertem Äther im *Soxhlet* extrahiert. Nach Verdampfung des Äthers wurde gewogen[6]) (und schließlich die

---

[1]) *Ida Smedley Maclean*, Biochem. Journ. **16**, 370–379, 1922; C. 1922, III, S. 630.

[2]) *C. Neuberg* und *B. Arinstein*, diese Zeitschr. **117**, 289, 1921; Zentralbl. f. Bakter. **57**, 95.

[3]) *H. Haen*, Zeitschr. f. techn. Biol. **9**, 217, 1921; Wochenschr. f. Brauerei 1922, S. 90.

[4]) *H. Haen* und *W. Kintoff*, Ber. d. deutsch. chem. Ges. **56**. 439–445, 1923; C. 1923, I, 775.

[5]) *Ida Smedley Maclean*, Biochem. Journ. **16**, 370–379; C. 1922, III, S. 630.

[6]) *A. Bellet*, Bull. de la soc. chim. de France (4) **13**, 565; Journ. de Pharm. et de Chim. (7) 8, 21; C. 1913, III, 457.

freien Fettsäuren mit n/10 Lauge titriert). In dieser Weise erhielten wir aber *keinen nennenswerten größeren Fettwert.*

c) Kohlenstoffbilanz.

In derselben Weise wie im Versuche 4, Teil I, S. 333 ist folgende Bilanztabelle aufgestellt und berechnet worden:

Tabelle IIa.

Kohlenstoffbilanz, betreffend den Zucker, der zu den Proben A und C zugesetzt wurde, und die Produkte, die aus diesem gebildet worden sind. Probe A: Zuckerzusatz + Sauerstoffschüttelung. Probe C: Zuckerzusatz ohne Sauerstoffschüttelung.

Probe:	A	C
Dextrose	0 g = 0 g C	0 g = 0 g C
Alkohol	30,3 g = 15,8 g C	32,0 g = 16,7 g C
Trockensubstanzzunahme als $C_6H_{10}O_5$ (Differenz A—B, bzw. C—D)	12,4 g = 5,5 g C	11,5 g = 5,1 g C
Organische Säuren als Essigsäure	1,0 g = 0,4 g C	1,0 g = 0,4 g C
Kohlensäure (Differenzberechnung)	36,0 g = 10,3 g C	35,0 g = 9,8 g C
Dextrose zugesetzt	80,0 g = 32,0 g C	80,0 g = 32,0 g C

Tabelle IIb.

Von dem Kohlenstoffgehalt des zugesetzten Zuckers sind in Form von:

Probe:	A		C		Nach der Gärungsformel berechnet
Alkohol	49,4 Proz. C	66,6 Proz.	52,2 Proz. C	68,1 Proz.	66,7 Proz. C
Kohlenhydratzunahme $C_6H_{10}O_5$	17,2 „ C		15,9 „ C		0 „
Organ. Säuren	1,3 „ C		1,3 „ C		0 „
Kohlensäure	32,1 „ C		30,6 „ C		33,3 „
	100,0 Proz. C		100,0 Proz. C		100,0 Proz. C

Eine nähere Betrachtung der beiden Tabellen V, Teil I, S. 334, und II, Teil II, ergibt, daß die in den beiden Versuchen erhaltenen Resultate vollständig eindeutig sind.

Es ergibt sich ebenso wie in den früheren Versuchen, daß die Summe der Kohlenstoffgehalte des gebildeten Alkohols und der neugebildeten Kohlehydrate durchaus übereinstimmt mit dem Kohlenstoffgehalt der theoretischen Alkoholmenge der gewöhnlichen Gärung, derart, daß wir unsere Annahme einer sekundären Umwandlung von Alkohol in Kohlehydrat auf das beste bestätigt finden.

d) Stickstoffbilanz.

Wir wenden uns jetzt den stickstoffhaltigen Substanzen zu.

Tabelle III.

Zusammenstellung der Untersuchungsresultate an den Stickstoffsubstanzen der Proben A, B, C, D und E. Die Ziffern geben die verschiedenen Substanzen in Milligrammen N an. Probe A: Sauerstoffzufuhr mit Zuckerzusatz. Probe B: Sauerstoffzufuhr ohne Zuckerzusatz. Probe C: Zuckerzusatz ohne Sauerstoffzufuhr. Probe D: Ohne Zuckerzusatz, ohne Sauerstoffzufuhr. Probe E: Die ursprüngliche Hefe direkt untersucht.

Probe:	A	B	C
1. Wasserunlöslicher bzw. koagulierbarer Eiweiß-N . . . mg	990 = 70,2 Proz.	950 = 67,8 Proz.	1010 = 72,6 Proz.
2. Polypeptid-N . „	370 = 26,3 „	371 = 26,6 „	333 = 24,0 „
3. Formol-N . . . „	50 = 3,5 „	79 = 5,6 „	47 = 3,4 „
Gesamt-N . . . . mg	1410 = 100 Proz.	1400 = 100 Proz.	1390 = 100 Proz.

Probe:	D	E
1. Wasserunlöslicher bzw. koagulierbarer Eiweiß-N . . . mg	—	1000 = 71,5 Proz.
2. Polypeptid-N . „	—	342 = 24,4 „
3. Formol-N . . . „	87 = 6,3 Proz.	58 = 4,1 „
Gesamt-N . . . . mg	1390 = 100 Proz.	1400 = 100 Proz.

Der Polypeptidstickstoff ist als Differenz berechnet worden. Mit der Biuretreaktion oder mit der *Heller*schen Probe nachweisbare Verbindungen, Albumose und Peptone, sind nicht vorhanden.

Wir wollen hier gleichzeitig die *im nächsten Versuch 2* (S. 353) erhaltenen Resultate der Stickstoffanalyse betrachten.

Tabelle IV.

Untersuchungsresultate der Stickstoffsubstanzen der Proben A und B des Versuches 2, S. 353. Die Ziffern geben die verschiedenen Substanzen in Milligrammen an. Probe A: Sauerstoffschüttelung mit Zuckerzusatz. Probe B: Sauerstoffschüttelung ohne Zuckerzusatz.

Probe:	A	B
a) Reinprotein N . . . . mg	945 = 85 Proz.	888 = 80 Proz.
b) Übrige N-Substanz N . . „	165 = 15 „	222 = 20 „
Gesamt-N . . . . mg	1110 = 100 Proz.	1110 = 100 Proz.

Das Reinprotein ist hier durch Fällung mit Kupferhydroxyd nach *Barnstein* bestimmt worden.

Wenn wir die Tabelle III betrachten, finden wir, daß in den Zuckerproben A und C der Gehalt an wasserunlöslichem bzw. koagulablem Eiweiß derselbe ist wie in der ursprünglichen Hefe E. In der Probe B, ohne Zucker, und wahrscheinlich auch in der Probe D ist dieser Gehalt etwas niedriger wegen einer beginnenden Autolyse in diesen beiden Proben, die ihren stärksten Ausdruck in der kräftigen Steigerung des Formolstickstoffs findet. B enthält **58 Proz.** und D **85 Proz.** mehr Formolstickstoff als A bzw. C. In der Tabelle IV finden wir in B gegenüber A auch eine kleine Abnahme des durch Kupferhydroxyd fällbaren Stickstoffs.

Im ganzen können wir sagen, daß die Eiweißsubstanzen durch die verschiedenen Behandlungsweisen der Hefe in den verschiedenen Proben *wenig beeinflußt* worden sind.

Durch die peptischen, tryptischen und ereptischen Enzyme der Hefe werden Eiweißkörper aller Art der Zelle gelöst und abgebaut [vgl. *Dernby*[1])]. Albumosen treten während des ganzen Spaltungsprozesses nur vorübergehend und in geringer Menge auf; Pepton (im Sinne *Kühnes*) ist auch intermediär nicht nachweisbar und kommt auch in der normalen Hefe nicht vor.

Aus der stärkeren Bildung von Formolstickstoff in der Probe D als in der Probe B (sauerstoffgelüftet) könnte man vielleicht herauslesen, daß Sauerstoff die Autolyse hemmt. Wegen der beträchtlichen Versuchsfehler und wegen der geringen Autolyse wollen wir uns aber doch nicht darüber aussprechen.

Nach *N. Iwanoff*[2]) erscheint von den Gärungsprodukten der Alkohol als der Haupthemmungsfaktor des Eiweißzerfalles. In unseren Proben A und C könnten wir eine Bestätigung dieses Befundes sehen. [Nach *Gromow*[3]) wird die Wirkung der proteolytischen Enzyme durch Alkohol und vergärbaren Zucker, weiter Lactose, Mannit und Glycerin gehemmt.] *Dernby*[4]) hat gefunden, daß die Hefeautolyse bei einer Wasserstoffionenkonzentration von $p_H = 6{,}1$ optimal verläuft. Diese Konzentration dürfte auch in den Proben B und D vorhanden gewesen sein, währenddem die Proben A und C eine bedeutend größere Wasserstoffionenkonzentration enthalten. Hierin könnte die Ursache zu der in B und D beobachteten Autolyse liegen.

Versuch 2, Dextrose, und Versuch 8, Lävulose.

Diese beiden Versuche sind wie die übrigen bisher beschriebenen ausgeführt worden. In den Hauptproben A 50 g Preßhefe und 500 ccm Zuckerlösung; in den Blindproben B dasselbe, aber ohne Zucker. Im

---

1) *K. G. Dernby*, diese Zeitschr. 81, 107—208, 1917.
2) *N. Iwanoff*, diese Zeitschr. **120**, 62—80.
3) *T. Gromow*, H. **42**, 299, 1904; vgl. *Euler* und *Dernby*, H. **89**, 408, 4.
4) *K. G. Dernby*, diese Zeitschr. 81, 107—208, 1917.

Versuch 2 wurden *15 g Dextrose* verwendet und im Versuch 3 *10 g Lävulose*. Beide Versuche wurden in dem Moment abgebrochen, als der Zucker verschwand. Versuchszeit bei Versuch 2: 3 Stunden, Versuch 3: 5 Stunden. Im Versuch 2 wurden Trockensubstanzbestimmungen und Kohlehydratanalysen ausgeführt; im Versuch 3 dagegen nicht.

Der Versuch 3 zeigt, daß sich Lävulose so wie Dextrose verhält; im übrigen ergeben die Versuche nichts Neues, sondern bestätigen nur das, was in den vorigen Versuchen gefunden wurde.

Tabelle V (Versuch 2).

Analysenresultate der Trockensubstanz der Proben A und B. Die Ziffern geben die verschiedenen Substanzen in Grammen an. Probe A: Sauerstoffschüttelung und Zuckerzusatz. Probe B: Sauerstoffschüttelung ohne Zuckerzusatz.

Probe:	A	B
1. Stickstoffsubstanzen . . . . g	7,0 = 44,9 Proz.	7,0 = 58,3 Proz.
2. Fett . . . . g	0,2 = 1,3 „	0,2 = 1,7 „
3. Kohlehydrate $C_6H_{10}O_5$		
a) Totalgehalt . . . . . . g	7,4 = 47,4 „	3,8 = 31,7 „
b) „Leicht hydrolysierbare“ g	3,2 = 20,5 Proz.	1,4 = 11,7 Proz.
c) „Schwer hydrolysierbare“ (a—b) . . . . g	4,2 = 26,9 „	2,4 = 20,0 „
4. Asche . . . . g	1,0 = 6,4 Proz.	1,0 = 8,3 Proz.
Totale Trockensubstanzmenge 1+2+3a+4 . . . . . . g	15,6 = 100,0 Proz.	12,0 = 100,0 Proz.

Von dem assimilierten Alkohol haben **50 Proz.** „leicht hydrolysierbare“ und **50 Proz.** „schwer hydrolysierbare“ Kohlehydrate gebildet.

Tabelle VI.

Kohlenstoffbilanz der Probe A des Versuches 2.

			Nach der Gärungsformel Proz.
Alkohol	4,60 g = 2,40 g C = 40,0	66,6 Proz.	66,7
Kohlehydratzuwachs $C_6H_{10}O_5$ . .	3,60 g = 1,60 g C = 26,6		
Kohlensäure	5,30 g = 1,50 g C = 25,0	33,4 „	33,3
Manko	0,50 g C = 8,4		
Zucker zugesetzt	15,00 g = 6,00 g C = 100,0 Proz.		100,0

Vergärungsgrad, nach der Alkoholausbeute berechnet, $\frac{40,0 . 100}{66,7}$ = 60 Proz. Alkoholgehalt in der Versuchsflüssigkeit = $\frac{4,60}{535}$ = 0,86 g in

100 ccm. In der sauerstoffgeschüttelten Probe ist eine Assimilation von $\frac{266 . 100}{40,0 + 26,6}$ = 40 Proz. des gebildeten Alkohols eingetreten.

Die obenstehende Tabelle bestätigt unsere Annahme, daß die Zuckerassimilation über Alkohol als Zwischenprodukt verläuft; so auch die folgende Bilanztabelle des Versuches 3. *Auch hier wiederum entspricht Alkoholkohlenstoff und Kohlenstoff der neugebildeten Kohlehydrate 66,6 Proz.; entspricht also der theoretischen Ausbeute an Alkoholkohlenstoff bei der typischen Gärung.*

Tabelle VII (Versuch 3).

Kohlenstoffbilanz der Probe A des Versuches 3.

			Nach der Gärungsformel Proz.
Alkohol	2,28 g = 1,20 g C = 30	67 Proz.	66,7
Kohlehydratzuwachs . .	= 1,48 g C = 37		
Kohlensäure	4,80 g = 1,32 g C = 33		33,3
Zucker zugesetzt	10,00 g = 4,00 g C = 100 Proz.		100,0

Die gebildeten Kohlehydrate sind nicht analytisch bestimmt, sondern durch Differenzberechnung aus den CO_2- und Alkoholwerten erhalten worden.

Auch in diesem Versuch ist wiederum die Summe Alkoholkohlenstoff + Kohlenstoff der neugebildeten Kohlehydrate rund 67 Proz.

Vergärungsgrad 45 Proz.

Alkoholgehalt der Versuchsflüssigkeit **0,42** g.

Assimilierter Alkohol **55 Proz.**

In dem Versuch 2 wurden Bestimmungen von Reinprotein nach *Barnstein* ausgeführt.

Versuch 4, Galaktose.

500 ccm einer Galaktoselösung, enthaltend 10 g Galaktose, wurden nit 50 g Preßhefe unter Sauerstoffschüttelung behandelt. Nach Stunden wurde eine Zuckerbestimmung ausgeführt, die ergab, daß ıoch 8,7 g Galaktose in der Versuchsflüssigkeit vorhanden waren, nd daß die Hefe nur 1,3 g vergoren hatte.

Von den vergärbaren Hexosen (d-Glykose, d-Fructose, d-Mannose nd d-Galaktose) wird ja bekanntlich die d-Galaktose am langsamsten ergoren.

Von einer intensiven Sauerstoffbehandlung wird also die Gärungseschwindigkeit der Galaktose nur wenig beeinflußt.

Überblick.

a) Tabelle VIII.

Zusammenstellung der in den Versuchen 3, 4 (Teil I) und in den Versuchen 1, 2 und 3 (Teil II) erhaltenen Analysenresultate. Die Werte der Tabelle beziehen sich auf das Gärungsstadium, wo der Zucker gerade verschwindet. Eine, auch teilweise Veratmung der Assimilationsprodukte ist dann noch nicht eingetreten. Die Proben A umfassen eine Zuckergärung unter Sauerstoffschüttelung. Die Proben B umfassen eine Selbstgärung (ohne Zucker) unter Sauerstoffschüttelung. Die Proben C umfassen eine Zuckergärung ohne extra Sauerstoffzufuhr. Die Proben D umfassen eine Selbstgärung (ohne Zucker) ohne extra Sauerstoffzufuhr. Die Proben E repräsentieren die ursprüngliche Hefe. Die Versuche 3 (Teil I), 3 (Teil II), 2 (Teil II) und 4 (Teil I) enthielten pro 100 ccm Versuchslösung 9,35 g Preßhefe; der Versuch 1 (Teil II) 12,00 g. Der Trockensubstanzgehalt der Hefe betrug in allen Versuchen etwa 25 Proz.; der Eiweißgehalt etwa 50 Proz. der Trockensubstanz. Die Ziffern der Tabelle beziehen sich auf 100 ccm der Versuchslösung. Versuchstemperatur 12 bis 20° C.

Teil:	I	II	II	I	II	
Versuch:	3	3	2	4	1	
1. Versuchszeit in Stunden	9	5	3	21	29	
2. Zugesetzter Zucker in g	1,87	1,87	2,80	7,95	12,00	
3. Hefetrockensubstanz n. d. Versuche in g						
Probe A	2,86	2,90	2,92	3,24	4,83	
„ B	2,24	2,26	2,24	2,12	2,96	
„ C	2,72	—	—	3,28	4,77	
„ D	2,44	—	—	2,18	3,04	
„ E	2,48	—	—	2,22	3,06	
4. Die absoluten Trockensubstanzzunahmen in g						
a) A − B	0,62	0,64	0,68	1,12	1,85	Abb. 3
b) A − E	0,38	—	—	1,02	1,75	
c) C − D	0,28	—	—	1,10	1,70	
d) C − E	0,24	—	—	1,06	1,69	
5. Die Trockensubstanzzunahmen (A − B und C − D) in den Proben A und C in Proz. von d. ursprünglichen Zuckermenge						
Probe A	33	34	24	14	15	Abb. 4
„ C	15	—	—	14	14	
6. Theoretische Alkoholmenge nach der Gärungsformel in g						
Proben A und C	0,96	0,96	1,43	4,07	6,15	
7. g Alkohol in der Lösung nach d. Gärung						
Probe A	0,43	0,42	0,86	3,04	4,56	
„ C	0,73	—	—	3,12	4,81	
8. Assimilierter Alkohol in g (6 − 7)						
Probe A	0,53	0,54	0,57	1,03	1,59	Abb. 2
„ C	0,23	—	—	0,95	1,34	

Tabelle VIII (Fortsetzung).

Teil	I	II	II	I	II	
Versuch:	3	3	2	4	1	
9. Vergärungsgrad des Zuckers nach der Alkoholausbeute berechnet $= \frac{7 . 100}{6}$						
Probe A	45	44	60	75	74	Abb. 3
„ C	76	—	—	77	78	
10. Assimilierter Alkohol in Proz. von dem theoretischen Alkoholgehalt $= \frac{8 . 100}{6}$						
Probe A	55	56	40	25	26	Abb. 1
„ C	24	—	—	23	22	
11. Totaler Gehalt an Kohlehydraten in g (Gesamtgehalt)						
Probe A	—	—	1,38	2,01	3,24	
„ B	—	—	0,71	0,89	1,38	
„ C	—	—	—	2,04	3,15	
„ D	—	—	—	0,95	1,44	
„ E	—	—	—	0,98	1,46	
12. Gesamtgehalt an „leicht" hydrolysierbaren Kohlehydraten in g						
Probe A	—	—	0,60	0,97	1,82	
„ B	—	—	0,26	0,37	0,69	
„ C	—	—	—	0,98	1,73	
„ D	—	—	—	0,37	0,71	
„ E	—	—	—	0,48	0,77	
13. Das Verhältnis zwischen den „leicht" hydrolysierbaren und den gesamten Kohlehydraten $= \frac{12}{11} \cdot 100$ in Prozenten						
Probe A	—	—	44	48	56	
„ B	—	—	37	42	50	
„ C	—	—	—	48	55	
„ D	—	—	—	39	49	
„ E	—	—	—	49	58	

b) Über die Assimilation des aus dem Zucker gebildeten Alkohols.

Die Kurven der Abb. 1 und 2 zeigen, daß die Assimilation (die Glykogenspeicherung wird dabei eingerechnet) des Zuckers über Alkohol als Zwischenprodukt bei intensiver Sauerstoffbehandlung *desto vollständiger ist, je geringer die anfängliche Zuckerkonzentration war.* Von einem Zuckergehalt von etwa 6 g pro 100 ccm ab (entsprechend einer totalen Menge gebildeten Alkohols von 3 g) verläuft die Assimilation, die dann konstant 20 bis 25 Proz. beträgt, der Zuckerkonzentration *proportional* (wenigstens bis zu 12 g Zucker in 100 ccm). Bei gewöhnlicher Gärung ohne Extrazufuhr von Sauerstoff ist dagegen das Verhältnis $\frac{\text{assimilierter Alkohol}}{\text{totale Menge gebildeten Alkohols}}$ immer *konstant* (wenigstens

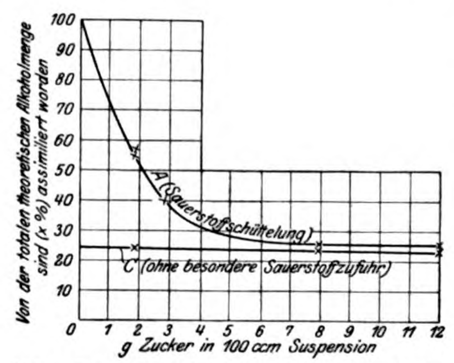


Abb. 1. Die *prozentuale Assimilation* der theoretischen Alkoholmenge in den Proben *A* und *C*. Die Werte sind der Tabelle VIII, 10 entnommen.

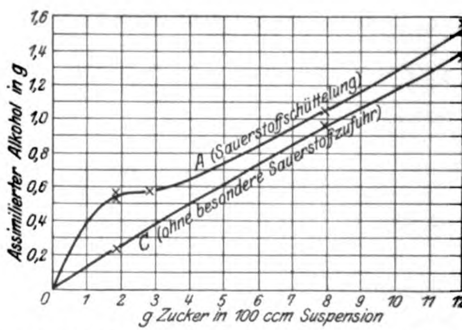


Abb. 2. Die *absolute Assimilation*. Gramm assimilierter Alkohol in den Proben *A* und *C*. — Der nähere Verlauf der Kurve *A* ist aus der Kurve *A* der Abb. 1 konstruiert worden. — Die Werte sind der Tabelle VIII, 8 entnommen.

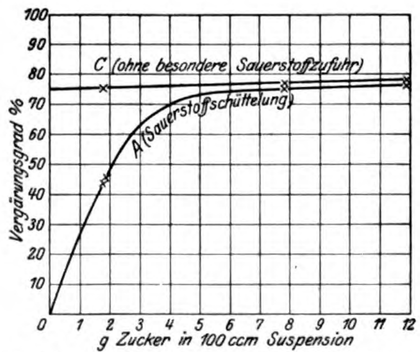


Abb. 3. Vergärungsgrad des Zuckers in den Proben *A* und *C* nach der Alkoholausbeute berechnet. Die Werte sind der Tabelle VIII, 9 entnommen.

innerhalb eines Bereiches von 0 bis 12 g Zucker) und beträgt auch 20 bis 25 Proz., unabhängig von der Zucker- (und Hefe-) Konzentration.

Der Sauerstoff übt nur in Konzentrationen zwischen 0 und 4 bis 6 g Zucker pro 100 ccm einen Einfluß, und zwar einen günstigen aus. Je kleinere Konzentration, desto stärkerer Einfluß. (Von 4 Proz. ab wird auch die Vermehrung der Hefezellen, wenn eine günstige Stickstoffquelle zur Verfügung steht, träge, und es scheint, als ob diese Konzentration von großer Wirkung auf die Hefe wäre.)

Aus der Tabelle VIII, 1., geht hervor, daß, je nach der Gärkraft der Hefe, die Zeiten, die für die vollständige Vergärung des Zuckers notwendig sind, sehr stark wechseln. Das Ausmaß der Assimilation des gebildeten Alkohols ist aber von der Schnelligkeit der Vergärung vollständig unabhängig und, wie aus den Kurven hervorgeht, ebenso auch von der verwendeten Hefemenge, vorausgesetzt, daß dieselbe nicht unter einem gewissen Ausmaße bleibt, d. h. so viel Hefe muß vorhanden sein, daß ihr maximales Vermögen, Alkohol aufzunehmen, nicht erreicht wird.

Wenn genügend Hefe zur Verfügung steht und die Versuchsflüssigkeiten 1. der Luft ausgesetzt sind, ist die *absolute*

Assimilation (d. h. die Gewichtsmenge assimilierten Alkohols = theoretische Menge minus wirklich gefundener Menge) der Zucker- (Alkohol-) Konzentration proportional und sonst nur von dem Gärungsstadium abhängig, aber nicht von der Hefemenge und der Zeit, die erforderlich ist, um das betreffende Gärungsstadium zu erreichen[1]. Die *prozentuale Assimilation* (d. h. jene Zahl, welche angibt, wieviel Prozent der theoretischen, aus der Gärungsformel berechneten Alkoholmenge assimiliert worden sind), die in dem Stadium, wo der Zucker eben verschwindet, etwa 25 Proz. (von dem totalen gebildeten Alkohol) beträgt, ist für dieses Stadium konstant, und diese Konstante ist unabhängig von der Hefemenge, der Zeit, die erforderlich war, um dieses Stadium zu erreichen, sowie von der Zuckerkonzentration (s. Abb. 1).

2. Wird Sauerstoff extra zugeführt und die Gärungskohlensäure schnell entfernt, so wird sowohl die *absolute* wie die *prozentuale* Assimilation bei Zuckerkonzentrationen zwischen 0 und 4 bis 6 g pro 100 ccm erheblich gesteigert. Die Assimilation wird dabei vollständiger, je geringer die ursprüngliche Zuckerkonzentration war.

Wenn wir den aus den Alkoholausbeuten berechneten Vergärungsgrad des Zuckers in den Proben A und C, Abb. 3, ins Auge fassen, so sind die ihn darstellenden Kurven, wenn wir die Alkoholassimilationsvorgänge mit und ohne Sauerstoffzufuhr kennen, ohne weiteres verständlich und brauchen deshalb keine näheren Erläuterungen.

Die so ermittelten Vergärungsgrade sind nur *scheinbar*. In Wirklichkeit betragen sie überall 100 Proz., aber der gebildete Alkohol wird zum Teil assimiliert, wodurch sie scheinbar kleiner werden. Man beachte, daß sich in allen Stadien der jeweilige Vergärungsgrad (Ordinaten in Abb. 3) und die prozentuale Assimilation (Ordinaten in Abb. 1) jeweilig zum Werte = 100 ergänzen.

Wir wollen jetzt die Kurven über die Trockensubstanzzunahme und die entsprechenden Tabellenwerte, Tabelle VIII, 4 und 5, behandeln. Zunächst wollen wir erörtern, wie die Trockensubstanz in solchen Versuchen, wie die unserigen, bestimmt werden muß, damit auch der Assimilation volle Rechnung getragen wird, und ob dabei Vereinfachungen erlaubt werden können.

Bisher hat man die Assimilation der Hefe quantitativ dadurch verfolgt, daß man Trockensubstanzbestimmungen vor und nach dem Versuch ausgeführt hat. Die positive Differenz zwischen den erhaltenen Werten hat man als mit den durch die Assimilation entstandenen neuen Substanzen identisch angesehen. Dementsprechend würden in

[1]) Wenn wir also z. B. das Ausmaß der Assimilation zu dem Zeitpunkte, wo der Zucker eben ganz verschwunden ist, feststellen, erscheint dasselbe unabhängig davon, ob die Gärung langsam oder schneller verlaufen ist.

unseren Versuchen die Differenzen A—E und C—E die Assimilation darstellen. Diese Werte repräsentieren aber nicht die wahre Assimilation, denn hier ist keine Rücksicht auf die für die Lebenstätigkeit der Hefe notwendige Atmung genommen, die mit einem gewissen Verbrauch an Hefekohlehydrate verbunden ist. Die Werte A—B und C—D geben dagegen ein wahres Bild von den Verhältnissen.

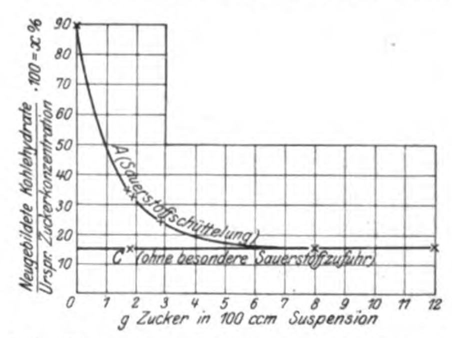


Abb. 4. Die durch Assimilation neugebildeten Kohlehydrate (*A—B* und *C—D*) in den Proben *A* und *C* in Prozenten von der ursprünglichen Zuckerkonzentration. Die Werte sind der Tabelle VIII, 5 entnommen worden. 180 Teile Zucker ($C_6H_{12}O_6$) geben 162 Teile Assimilationsprodukte ($C_6H_{10}O_5$). $\frac{162}{180} \cdot 100 = 90$ Proz.

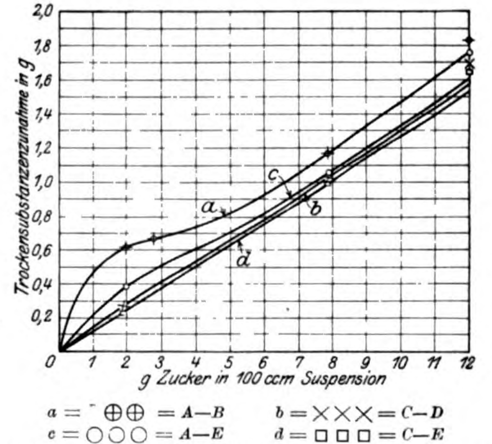


Abb. 5. Die neugebildeten Kohlehydrate = die Trockensubstanzzunahme in Gramm. Die Werte sind der Tabelle VIII, 4 entnommen. Der nähere Verlauf der Kurve *a* ist aus der Kurve *A* der Abb. 4 konstruiert worden. [Wie aus der Abb. 5 ersichtlich ist, ist die Assimilation bei 12 g Zucker pro 100 ccm verhältnismäßig stärker, als bei niederen Konzentrationen (8 g). Dies kommt davon, daß die Hefekonzentration bei 12 g bedeutend größer war als in den übrigen Fällen.]

1. Wenn wir uns zunächst dem Falle zuwenden, wo Sauerstoff nicht extra zugeführt worden ist, aber wo der Luftsauerstoff Zutritt gehabt hat, sehen wir aus den Kurven b (= C—D) und d (= C—E), die denselben Verlauf aufweisen, daß wir in diesem Falle die veratmeten Kohlehydrate vernachlässigen können, und die durch Assimilation neugebildeten einfach durch Trockensubstanzbestimmungen vor und nach dem Versuch ermitteln können. Der Versuch darf dann aber nicht lange über den Zeitpunkt hinaus, wo der Zucker gerade verschwindet, ausgestreckt werden, denn sonst tritt eine zu starke Veratmung der gebildeten Kohlehydrate ein.

2. *In dem Falle aber, wo extra Sauerstoff zugeführt worden ist und wo ein starker Einfluß desselben auf die Assimilation bei Zuckerkonzentrationen zwischen 0 und 4 bis 6 g Zucker pro 100 ccm konstatiert worden ist* (s. Abb. 1 und 2), *ist es dagegen notwendig, die veratmeten Kohlehydrate zu berücksichtigen.* Die

Kurve a (= A—B) und c (= A—E) zeigen nämlich bei Zuckerkonzentrationen zwischen 0 und 4 bis 6 g Zucker pro 100 ccm einen ganz verschiedenen Verlauf, und in diesem Konzentrationsbereich bekommt man durch einfaches Vergleichen zwischen den Trockensubstanzmengen vor (A) und nach dem Versuch (E) einen viel zu kleinen Wert auf die durch Assimilation neugebildeten Kohlehydrate. *Es ist deshalb notwendig, durch Blindversuche die durch die Atmung verschwundenen Kohlehydrate zu ermitteln und in Rechnung zu setzen.*

Bei Konzentrationen über 4 bis 6 g Zucker pro 100 ccm gilt dagegen, was unter 1. gesagt worden ist.

Alle derartige quantitativen Angaben über die Assimilation, die gleichzeitig das Gärungsstadium nicht angeben, sind nicht, besonders wenn der Sauerstoff einen reichlichen Zutritt gehabt hat, vergleichbar und verlieren deshalb an Wert. Man muß wissen, wie weit die Vergärung fortgeschritten ist und ob die Assimilationsprodukte eventuell teilweise veratmet worden sind.

Eine Diskussion der Kurven in der Abb. 4 würde dasselbe Ergebnis wie bei der eben behandelten Alkoholassimilation geben, und wir verweisen deshalb auf diese.

Bokorny[1]) hat gefunden, daß die Verwertung des Zuckers zum Aufbau von Hefesubstanz am günstigsten bei 6 Proz. Zucker in der Lösung ist, und daß niedrigere Konzentrationen weniger ungünstig sind als höhere. Dieser Forscher verwendete auch die Trockensubstanzzunahme als Maß für die Assimilation. Er hat bei seinen Versuchen mit keiner Extrazufuhr von Sauerstoff gearbeitet, wodurch seine Resultate mit den unsrigen aus den Proben C vergleichbar sind, wenn wir davon absehen, daß er eine Stickstoffquelle, Harn (liefert bei der Assimilation keine Kohlehydrate), verwendete und wir keine. Wir finden keine Bestätigung seiner Befunde; die Assimilation scheint proportional mit der Zuckerkonzentration zu verlaufen. Bei der sauerstoffbehandelten Probe A, Abb. 4 und 5, Kurve a, ist die Verwertung des Zuckers am besten bei einem Gehalte von 0 bis 2 g von dieser Substanz pro 100 ccm. Von 4 bis 6 g ab wird sie auch hier der Zuckerkonzentration proportional.

Die Tabelle und die Kurven zeigen weiter, daß in allen Fällen auch bei niedriger Zuckerkonzentration eine Trockensubstanzzunahme eingetreten ist. Keine Abnahme kann wahrgenommen werden. *Bokorny*[2]) hat dagegen gefunden, daß, wenn Zucker die einzige Kohlenstoffquelle ist (N-Quelle = Harn) und größere Hefemengen gegeben werden (2 g Preßhefe auf 2 g Zucker = 25 ccm Volumen; entsprechend unserem Versuche 4, Teil I, wo 9 g Hefe und 8 g Zucker in 100 ccm vorhanden waren), eine Verminderung der Hefetrockensubstanz eintritt (Versuchszeit über 5 Tage); wenn er dagegen 0,02 bis 0,1 g Hefe auf 2 g Zucker verwendete, bekam er eine vielfache Vermehrung. *Euler*[3]) fand auch in einer Lösung von 5 g

[1]) *Th. Bokorny*, Allgem. Brauer- u. Hopfenz. 1918, S. 1183—1184, 1191—1192.

[2]) *Derselbe*, diese Zeitschr. 81, 219—262.

[3]) *Euler* und *Lindner*, Chemie der Hefe und der alkoholischen Gärung.

Hefe (30 Proz. Trockensubstanz) in 500 ccm Glykoselösung nach 32 Stunden einen kleineren Trockensubstanzgehalt mit weniger Glykogen als vor dem Versuche (vgl. Teil I, S. 314). Diese Tatsachen lassen sich dadurch erklären, daß die Versuchszeit zu lang ausgedehnt wurde, wobei die ursprünglichen Reservestoffe und die von dem Zucker durch Assimilation gebildeten zum großen Teil veratmet wurden, wodurch schließlich eine Verminderung des Trockensubstanzgewichtes eintrat.

In dem Versuche 1, Teil I (5 g Zucker in 535 ccm, wie bei *Euler*), wo die Versuchszeit zwar nur 17 Stunden betrug, aber wo trotzdem das Stadium, in dem der Zucker gerade verschwindet, längst überschritten war, und wo also eine starke Verbrennung der assimilierten und ursprünglich vorhandenen Reservestoffe eingetreten war, dürfte, wie Durchrechnung der Versuchsresultate ergibt, auch eine merkliche Verminderung der Trockensubstanz erfolgt sein.

Aus den Versuchsdaten ist ersichtlich, daß in Versuch 1 (Teil II) bei *gleichbleibender Zellenzahl eine Trockensubstanzzunahme* von 60 Proz. der ursprünglichen Menge eingetreten ist. Die Zellen müssen also infolge der Assimilation während des Versuches bedeutend größer geworden sein. *Zikes*[1]) hat auch gefunden, daß, je konzentrierter die Würze ist (die Zellenvermehrung wird mit der Steigerung der Konzentration immer schwächer), desto größere und kräftigere Zellen gebildet werden. Die Glykogenbildung ist dabei auch rascher und kräftiger. Auf die Gestalt und Form der Zelle übt die Konzentration einen kleineren Einfluß aus.

c) *Über die Relation zwischen den „leicht" und „schwer" hydrolysierbaren Kohlehydraten bei der Assimilation und Dissimilation der Hefe.*

Aus Tabelle VIII, 13., ersehen wir, daß das Verhältnis zwischen den „leicht" hydrolysierbaren (oder den „schwer" hydrolysierbaren) und den gesamten Kohlehydraten unter solchen Umständen, wo keine Veratmung erfolgt (Probe E) oder wenn eine solche stattfindet, wo die veratmeten Kohlehydrate ersetzt werden können (A und C), innerhalb desselben Versuches, also bei derselben Hefe, konstant ist (Versuch 4, Teil I: A = C = E = 48 bis 49 Proz.; Versuch 1, Teil II: A = C = E = 53 bis 56 Proz.).

Unabhängig von der Zucker- und Hefekonzentration und von der Größe der Assimilation strebt also die Hefe, in zuckerhaltigen Lösungen die durch die Atmung verschwindenden „leicht" hydrolysierbaren Kohlehydrate zu ersetzen und die Assimilation überhaupt so zu leiten, daß das Verhältnis zwischen diesen Kohlehydraten und den totalen immer eine konstante Größe ist, welche Größe in verschiedenen Hefeproben etwas schwankt, aber sich in der Nähe von 0,5 (= 50 Proz.) hält. Da die Assimilation nicht nur die verbrauchten Atmungskohlehydrate ersetzt, sondern auch viel weiter verläuft, müssen die assimilierten Stoffe zum Aufbau von sowohl „leicht" wie „schwer" hydrolysierbaren Kohlehydraten in dem Sinne verwendet werden, daß das obengenannte Ver-

[1]) *H. Zikes*, Zentralbl. f. Bakt. **49**, II. Abt., S. 174–181, 1919.

hältnis innegehalten wird. Da nur die „leicht" hydrolysierbaren Kohlehydrate veratmet oder vergoren werden, wird das Verhältnis bei einer Selbstgärung oder überhaupt unter solchen Umständen, wo die veratmeten Kohlehydrate nicht ersetzt werden können, verschoben, d. h. verkleinert. Vergleiche die Proben B und D gegenüber den Proben A, C und E.

Da die „schwer" hydrolysierbaren Kohlehydrate nicht veratmet werden können, müssen wir sie als notwendige Zellbestandteile betrachten. Die Synthese derselben steht in *keiner Beziehung zur Vermehrung der Hefe*, denn die Zellenzahl war in unseren Versuchen konstant. Dagegen *besteht eine strenge Relation zwischen dieser Assimilation und ler gleichzeitigen Aufspeicherung von Reservestoffen*, vor allem von ;lykogen (vgl. Teil I, S. 314, und Teil II, S. 348).

Dies spricht stark gegen die *Grüs*sche Glykogengärungstheorie, enn die neben der Glykogenspeicherung verlaufende Assimilation u unvergärbaren, „schwer" hydrolysierbaren Kohlehydraten würde ie eine so hohe Alkoholausbeute erlauben können, wie sie tatsächlich funden wird.

Unsere Annahme, daß Alkohol als Vorstufe für das Glykogen ent, erklärt, daß dasselbe aus *verschiedenen Zuckerarten* (nach Verrung) gebildet werden kann, und man braucht deshalb bei diesen ergärbaren) Zuckerarten keine isomerisierenden Enzyme, die die exosen ineinander umwandeln, anzunehmen, um die Glykogendung zu erklären.

Über die energetischen Verhältnisse bei der Assimilation und Dissimilation der Hefe.

In den Zuckerproben ist immer in der Hefe eine *Anreicherung leicht oxydierbaren und verbrennbaren Kohlehydraten* konstatiert den. Dies verursacht aber, *so lange noch Zucker in der Versuchssigkeit vorhanden ist*, *keine vermehrte Atmung* dieser Hefe gegenüber Hefe in den Blindproben, denn die Kohlenstoffbilanzen, die sich das Gärungsstadium, wo der Zucker gerade verschwindet, beziehen, en, daß die Atmung in den Haupt- und Blindproben dieselbe ist. den die Versuche aber länger ausgedehnt, tritt in den Hauptproben ählich eine stärkere Atmung als in den Blindproben ein (Versuch 1 2, Teil I).

Durch die Assimilation nehmen die Hefezellen in den Zuckeren an Größe zu (bei konstanter Zellenzahl). Die Zellen dieser en verbrauchen natürlich für das Erhalten ihres Lebens eine ere Energiemenge als diejenigen der Blindproben, die keinen chs erfahren.

Diesen Mehraufwand an Energie verschaffen sich aber die Zellen der Zuckerproben, nach dem, was oben gesagt worden ist, nicht durch eine erhöhte *Atmung*, sondern beziehen sie aus den bei der *Gärung* und der *Assimilation* des Alkohols entstandenen Energiemengen. Diese beiden Energiequellen, die Gärung und die Assimilation, scheinen gerade den erhöhten Energiebedarf zu decken (weil die Atmung in den Haupt- und Blindproben genau dieselbe ist). Wenn die eine von diesen Energiequellen, die Gärung, nicht mehr da ist, also nachdem der Zucker verschwunden ist, verschafft sich die Hefe einen Ersatz dadurch, daß sie die aufgespeicherten Kohlehydrate teilweise verbrennt.

e) Relation zwischen der Atmung bzw. der Sauerstoffzufuhr und der Gärung.

In den sauerstoffgeschüttelten Proben verschwand der Zucker durch Vergärung mit derselben Geschwindigkeit aus der Versuchsflüssigkeit wie in denjenigen Proben, die in Berührung mit der Luft standen. *Die Vergärungsschnelligkeit* erscheint also von der Sauerstoffzufuhr weitgehend unabhängig. Dagegen erscheint, wie aus den Versuchen hervorgeht, die *Atmungstätigkeit* der Hefe (charakterisiert durch Trockensubstanzabnahme und Kohlensäureproduktion) in hohem Grade von der Sauerstoffzufuhr abhängig.

Bei konstanter Zellenzahl erscheinen somit *Gär- und Atmungstätigkeit der Hefe ziemlich unabhängig voneinander*, was mit den neueren Forschungsergebnissen übereinstimmt.

Zusammenfassung der Resultate der Teile I und II.

In den eben beschriebenen Versuchen der Teile I und II ist die assimilatorische und dissimilatorische Tätigkeit der Preßhefe gegenüber Dextrose, Lävulose und Galaktose bei Sauerstoffzufuhr und ohne diese untersucht worden. Dabei wurde eine Suspension von Preßhefe in destilliertem Wasser mit verschiedenen Mengen (bei Dextrose 0,65 bis 12,00 g, bei Lävulose und Galaktose 1,87 g pro 100 ccm der Suspension) genannter Monosaccharide behandelt. Die Hefekonzentration war immer 9,35 g (in einem Falle 12,00 g) gewöhnlicher Handelshefe (mit etwa 25 Proz. Trockensubstanzgehalt) pro 100 ccm Versuchssuspension. Der Hefe wurde keine Stickstoffnahrung geboten. Von den Suspensionen standen einige an der Luft und die anderen wurden mit Sauerstoff geschüttelt; Versuchstemperatur 16 bis 20° C (in einem Falle 12°); Versuchsdauer 3 bis 29 Stunden.

Dextrose und Lävulose verhielten sich gegenüber der Hefe gleich, Galaktose wurde nur sehr wenig angegriffen.

Das Untenstehende bezieht sich auf Dextrose und Lävulose (aber nicht auf Galaktose).

1. In allen Fällen bewirkt die Hefe ein *schnelles und vollständiges Verschwinden des Zuckers* aus der Versuchsflüssigkeit.

2. Wegen Mangel an Stickstoffnahrung trat *keine* (oder nur eine schwache, 6proz.) *Vermehrung der Zellenzahl* der Hefe ein.

3. In den filtrierten Versuchsflüssigkeiten konnten nur in kleinen Mengen die gewöhnlichen aus dem Zucker stammenden *Nebenprodukte* der alkoholischen Gärung nachgewiesen werden. Die Hefe gibt nur sehr wenig Stoffe an die Lösung ab.

4. *Fett und Acetaldehyd* wurden nicht gebildet.

5. Auch die Sauerstoffbehandlung bewirkt *keine direkte Verbrennung des Zuckers und aus demselben gebildeten Alkohols* zu Kohlensäure und Wasser.

6. In allen Fällen, sowohl als die Versuchsflüssigkeit mit Sauerstoff behandelt wurde, wie als sie nur an der Luft stand, wurde eine *Assimilation eines Teiles des zugesetzten Zuckers zu höheren Kohlehydraten* (über Alkohol als Zwischenprodukt) durch die Hefe beobachtet.

Wenn die Versuche in dem Moment abgebrochen wurden, wo der Zucker eben verschwunden war, war die durch die Assimilation bedingte Trockensubstanzzunahme der Hefe immer größer als die durch die Veratmung der Reservekohlehydrate verursachte Abnahme.

7. In allen Versuchen, die in dem Moment, wo der Zucker gerade verschwunden war, abgebrochen wurden, ergab es sich, *daß die Summe der Kohlenstoffgehalte des jeweilig vorhandenen Alkohols und der infolge der Assimilation neugebildeten Kohlehydrate* durchaus mit dem Kohlenstoffgehalt der *theoretischen Alkoholmenge* der typischen Gärung derart übereinstimmte, daß *eine sekundäre Umwandlung von Teilen des gebildeten Alkohols in den Assimilationskohlehydraten angenommen werden mußte.* Die *Kohlensäurebildung* ist dieselbe, die bei einer typischen Gärung des verschwundenen Zuckers entstehen würde. *Zucker wird demnach von der Hefe nicht direkt assimiliert, sondern erst, nachdem er durch Vergärung in Alkohol umgewandelt worden ist.*

8. Die Gärung verläuft stets *nach der Gärungsformel* (wenn man von einer kleinen Bildung der gewöhnlichen Nebenprodukte absieht). Trotzdem findet man, wegen einer Assimilation des gebildeten Alkohols, nie die theoretische Menge desselben in der Versuchsflüssigkeit.

9. Bei der Assimilation wird *ein Drittel des totalen Energiegehaltes des (über Alkohol) assimilierten Zuckers frei*, das von der Hefe zum Teil oder vollständig ausgenutzt werden kann. Die restlichen zwei Drittel werden bei der Veratmung der neugebildeten „leicht" hydrolysierbaren Kohlehydrate der Hefe zum Teil zur Verfügung gestellt. Die Assimilationsprodukte enthalten wegen der bei der Gärung stattfindenden Abspaltung von Kohlensäure nur zwei Drittel des Kohlenstoffgehaltes des entsprechenden Zuckers. Die *Assimilation*, die mit einer Oxydation

und einer Energiebildung verbunden ist, *erscheint als eine Atmungs-(Verbrennungs-)Stufe*, und die *Gärung als eine Vorstufe der Atmung*, weil sie die nächsten Bausteine der Atmungskohlehydrate liefert. Um diese Kohlehydrate zu bilden, ist die Zelle, wenn Zucker die einzige Kohlenstoffquelle ist, auf die alkoholische Gärung angewiesen, und dieselbe ist unter diesen Umständen ein notwendiger Lebensvorgang.

10. Die Assimilationsprodukte bestanden nur aus Kohlehydraten. Dieselben sind *teils von „leicht"*, *teils von schwer hydrolysierbarem Charakter*. Unabhängig von der Zucker- und Hefekonzentration, strebt die Hefe in zuckerhaltigen Lösungen die Assimilation des gebildeten Alkohols so zu leiten, daß das *Verhältnis zwischen den „leicht"* [1]) *bzw. „schwer" hydrolysierbaren Kohlehydraten und den gesamten Kohlehydraten der Hefe* immer eine *konstante* Größe ist, welche Größe in verschiedenen Hefeproben etwas schwankt, aber sich in der Nähe von 0,5 (50 Proz.) hält.

11. Nur die „leicht" hydrolysierbaren Kohlehydrate, die hauptsächlich aus *Glykogen* bestehen, können vergoren oder veratmet werden, was durch einen Sauerstoffstrom stark befördert wird. Bei der Selbstgärung oder bei einer Atmung unter solchen Verhältnissen, wo die veratmeten Kohlehydrate nicht ersetzt werden können, wird das in 10. erwähnte Verhältnis verschoben. Wird Kohlenstoffnahrung zugeführt, bemüht sich die Hefe, das ursprüngliche Verhältnis wieder herzustellen.

12. *Die „schwer" hydrolysierbaren Kohlehydrate werden nicht veratmet bzw. vergoren* und sind deshalb notwendige Zellbestandteile. Die Synthese derselben steht in keiner Beziehung zur Vermehrung der Hefe. Dagegen besteht eine strenge Relation zwischen dieser Assimilation und der gleichzeitigen Aufspeicherung von Reservestoffen, vor allem in Form von *Glykogen*.

Die „schwer" hydrolysierbaren Kohlehydrate bestehen teils aus solchen, die *von 3proz. HCl löslich gemacht werden*, aber dabei keine reduzierenden Verbindungen bilden, und teils aus von dieser Säure *nicht angreifbaren* Kohlehydraten. Die ersteren erfahren bei der Assimilation des Alkohols eine viel stärkere Zunahme als die letzteren.

13. Die *Assimilation* des gebildeten Alkohols ist von der *Schnelligkeit der Vergärung* unabhängig. Die Zeiten, die erforderlich sind, um

---

[1]) Mit *„leicht" hydrolysierbaren* Kohlehydraten werden solche verstanden, die von 3proz. HCl hydrolysiert werden und dabei Spaltprodukte geben, die eine alkalische Kupferlösung reduzieren; mit *„schwer" hydrolysierbaren* die übrigen, welche zum Teil von 3proz. HCl in Lösung gebracht werden, aber dabei keine reduzierenden Verbindungen geben. (Die Summe der „leicht" hydrolysierbaren + „schwer" hydrolysierbaren Kohlehydrate = Gesamtkohlehydrate.)

ein gewisses Gärungsstadium zu erreichen, können je nach der Gärkraft der Hefe stark wechseln, aber die Assimilation ist unter sonst gleichen Umständen von diesen Zeiten unabhängig, aber durch das betreffende Gärungsstadium vollständig festgelegt.

a) Wenn genügend Hefe zur Verfügung steht und die Versuchsflüssigkeiten der Luft ausgesetzt sind, ist die *absolute Assimilation* (d. h. die Gewichtsmenge assimilierten Alkohols = theoretische Menge minus wirklich gefundener Menge) der Zucker- (Alkohol-) Konzentration proportional und sonst nur von dem Gärungsstadium abhängig, ıber nicht von der Hefemenge und der Zeit, die erforderlich ist, um las betreffende Gärungsstadium zu erreichen. *Die prozentuale Assimilation* (d. h. jene Zahl, welche angibt, wieviel Prozent der theoreischen, aus der Gärungsformel berechneten Alkoholmenge assimiliert vorden sind), die in dem Stadium, wo der Zucker eben verschwindet, twa 25 Proz. (von dem totalen gebildeten Alkohol) beträgt, ist unbhängig von der Hefemenge, der Zeit, die erforderlich war, um dieses stadium zu erreichen, sowie von der Zuckerkonzentration (s. Abb. 1, Teil II).

b) Wird Sauerstoff extra zugeführt und die Gärungskohlensäure chnell entfernt, so wird sowohl die *absolute* wie die *prozentuale* Assiilation bei Zuckerkonzentrationen zwischen 0 und 4 bis 6 g pro 100 ccm rheblich gesteigert. Die Assimilation wird dabei vollständiger, je eringer die ursprüngliche Zuckerkonzentration war (s. Abb. 1 und 2, eil II).

Wird in dem genannten Konzentrationsbereich bei intensiver auerstoffbehandlung die Versuchszeit genügend lange ausgedehnt, und eht dabei genügend Hefe zur Verfügung, so wird der gebildete Alkohol hließlich vollständig assimiliert. Bei der gleichzeitigen Atmung der efe werden dann die gebildeten „leicht“ hydrolysierbaren Kohlerdrate zu Kohlensäure und Wasser verbrannt (schließlich vollständig), ›durch die Kohlensäureproduktion weit über den Wert der theorechen Gärungsformel steigt.

14. Der Vergärungsgrad des Zuckers ist in Wirklichkeit immer t 100 Proz. Wenn man ihn aber aus den erhaltenen Alkoholmengen rch Division mit der theoretischen Alkoholmenge berechnet, wird bedeutend kleiner und wechselt verkehrt mit der prozentualen similation des gebildeten Alkohols nach 13., weil eben die ursprünglich ildete Alkoholmenge infolge Assimilation teilweise verschwindet b. 1 und 3, Teil II).

15. Die infolge der Assimilation neugebildeten Kohlehydrate ursachen bei gleichbleibender Zellenzahl eine *Vermehrung der Trockenstanz* der Hefe, die in dem Stadium, wo der Zucker gerade verwindet, über 60 Proz. der ursprünglichen Hefemenge betragen kann.

16. Der Umstand, daß Alkohol als Vorstufe für die Glykogenbildung dient, erklärt, daß Glykogen aus verschiedenen Zuckerarten (nach Vergärung) gebildet werden kann.

17. Die erhaltenen Resultate, betreffend den Vorgang bei der Glykogenbildung (vgl. 7.), stehen in Widerspruch zu der *Grüss*schen *Glykogengärungstheorie.* Die Vorstellung, daß der der Hefezelle zugesetzte Zucker nicht direkt, sondern erst nach *auf dem Umwege des Alkohols vollzogener Assimilation zu Glykogen verbrannt werden kann,* bildet eine Analogie zu der Ansicht von *Laquer*[1]), derzufolge *Traubenzucker im Muskel nicht direkt, sondern erst nach Umwandlung in eine leicht oxydierbare Form verwertet werden kann.*

18. Da das Gärungs- oder Selbstgärungsstadium bei der Assimilation eine große Rolle spielt (vgl. 13.), ist es von Wichtigkeit, daß dasselbe bei quantitativen Versuchen, vor allem, wenn Sauerstoff reichlich Zutritt gehabt hat, angegeben wird. Bei quantitativen Vergleichen zwischen verschiedenen Assimilationsversuchen ist es von Bedeutung, zu wissen, wieweit die Vergärung fortgeschritten ist bzw. ob die veratmungsfähigen Assimilationsprodukte teilweise oder ganz *veratmet* worden sind.

19. Was die Bestimmung der Menge der infolge der Assimilation neugebildeten Substanzen betrifft, so kann man in vielen Fällen, wenn Sauerstoff nicht extra zugeführt wird, und wenn die Versuche nicht lange über den Zeitpunkt hinaus, wo der Zucker aus der Suspension eben verschwindet, auf Trockensubstanzbestimmungen der Hefe vor und nach den Versuchen zu der Menge der neugebildeten Assimilationsprodukte schließen.

Werden dagegen die Versuche lange über den Zeitpunkt hinaus, wo der Zucker verschwindet, ausgestreckt, oder werden sie mit Sauerstoff in Konzentrationsbereichen zwischen 0 und 4 bis 6 g Zucker pro 100 ccm intensiv behandelt, so muß man durch *Blindversuche* die bei der Lebenstätigkeit der Hefe *veratmeten* Kohlenhydrate ermitteln und in Rechnung setzen.

20. Die *Eiweißsubstanzen* sind durch die verschiedenen Behandlungsweisen der Hefe wenig beeinflußt worden.

21. *Solange noch Zucker in der Versuchsflüssigkeit vorhanden ist,* verursachen die während des Versuches in der Hefe aufgespeicherten, leicht verbrennbaren Reservestoffe (Glykogen) keine vermehrte Atmung gegenüber Parallelproben mit Hefe ohne Zuckerzusatz. Nachdem der Zucker verschwunden ist, wird aber die Atmung der erstgenannten Hefe allmählich stärker als die der letztgenannten.

---

[1]) *Laquer*, Abbau der Kohlehydrate in quergestreiften Muskeln. Zeitschr. f. physiol. Chem. **122**, 26, 1922.

Wenn Zucker zugesetzt wird, nehmen die Zellen infolge der Assimilation an Größe zu (bei konstanter Zellenzahl) und verbrauchen dann für das Erhalten des Lebens eine größere Energiemenge als solche Zellen, denen kein Zucker zugesetzt wird und welche also keinen Zuwachs erfahren. Diesen Mehrbedarf an Energie deckt die zuckerbehandelte Hefe nicht durch eine erhöhte *Atmung*, sondern durch die bei der *Gärung* und der *Assimilation* des Alkohols entstandenen Energiemengen. Diese beiden Energiequellen, die Gärung und die Assimilation, scheinen gerade den erhöhten Energiebedarf zu decken. Wenn die eine von diesen Energiequellen, die Gärung, nicht mehr da ist, also nachdem der Zucker verschwunden ist, verschafft sich die Hefe einen Ersatz dadurch, daß sie die aufgespeicherten Kohlehydrate teilweise verbrennt.

22. Bei konstanter Zellenzahl der Hefe besteht *kein Zusammenhang* einerseits *zwischen der Atmung und der Gärung* der Hefe und andererseits zwischen der *Sauerstoffzufuhr und der Gärung.*

Diese sowie die vorausgegangene Arbeit (I. und II. Teil) ist als Dissertation zur Erlangung eines Doktorates der technischen Wissenschaften an der Technischen Hochschule in Wien eingereicht worden.

Über den Fettgehalt des Blutes bei der Avitaminose.

Von

J. A. Collazo (Montevideo) und **Gomez Bosch** (Barcelona).

(Aus der experimentell-biologischen Abteilung des pathologischen Instituts der Universität Berlin.)

(Eingegangen am 20. Juli 1923.)

Mit 2 Abbildungen im Text.

Wenn die Definition der Avitaminose als eines Zustandes herabgesetzter Assimilation oder gesteigerter Dissimilation, wie *A. Bickel* (1) in seiner Arbeit „Experimentelle Untersuchungen über den Einfluß der Vitamine auf Verdauung und Stoffwechsel und die Theorie der Vitaminfunktion" diese Krankheit charakterisiert hat, zutreffend ist, dann muß sich diese Störung in der Verwertung bzw. im Umsatz der verschiedenen organischen und anorganischen Nahrungsbestandteile von seiten des Körpers zeigen. Nachdem in einer Reihe von Arbeiten aus dem hiesigen Laboratorium diese Störungen am Eiweiß [*Tsuji* (2)], an den Kohlehydraten [*Collazo* (3)] und an anorganischen Salzen [*Miyadera* (4), *Morinaka* (5), *Yoshiue* (6), *Haramaki* (7)] untersucht worden waren, wendeten wir unsere Aufmerksamkeit dem Fettstoffwechsel bei dieser Krankheit zu. In Arbeiten von *Asada* (8) und *Naito* (15) wurde im hiesigen Laboratorium der Einfluß der avitaminösen Stoffwechselstörung auf den Fettgehalt und den Fettansatz (Neutralfett, Cholesterin und Lipoide) der Tierkörper und einzelner Organe untersucht. Meine Aufgabe war, den Gehalt des Blutes an Neutralfett, Cholesterin und Lipoiden bei der Avitaminose zu erforschen.

An einigen Reistauben hatte bereits *Ogata* und *Ciaccio* eine Hyperlipämie festgestellt, die recht beträchtliche Werte haben konnte.

Der Fettgehalt des Blutes, aus verschiedenen Komponenten zusammengesetzt, kann sich aus verschiedenen Quellen rekrutieren. Erstlich kommen hier das Nahrungsfett bzw. die Fettquellen (Kohlehydrate) in der Nahrung in Frage; zweitens muß man an eine Mobilisation im Körper vorhandener Fettdepots, soweit sie Nahrungsreserven darstellen, denken; drittens kann bei dem degenerativen Zerfall der Körperzellen im Verlaufe der Krankheit eine Dissoziation des Protoplasmas unter tropfiger Ausfällung von fettigen Substanzen stattfinden, und dieses Fett kann ebenfalls vom Blute aufgenommen werden.

Diese dritte Quelle des Fettes wird aber wohl immer erst in einem fortgeschrittenen Stadium der Krankheit zu fließen beginnen. So

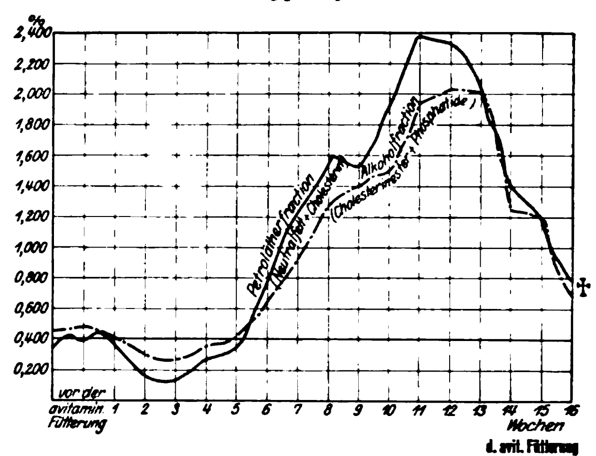
bleiben im Beginn der Avitaminose vor allem die beiden ersten Quellen für das Blutfett übrig, nämlich das resorbierte Fett und die resorbierten Fettquellen aus der Nahrung und das mobilisierte Fett aus den Nahrungsfettreservedepots des Körpers.

Das Nahrungsfett wird nach dem *Tsuji*schen Versuche bei der Avitaminose offenbar so gut wie vollständig resorbiert, ebenso die Kohlehydrate, die die vornehmlichsten Fettquellen aus der Nahrung sind. Bei dem Nahrungsfett liegen die Verhältnisse einfach. Hier kann bei der Avitaminose entweder das Fett nicht genügend rasch von den Körperzellen aufgenommen werden, oder es kann nach der Aufnahme nicht in Fettdepots abgelagert bzw. dort festgehalten werden, oder es kann zu rasch verbrannt werden. Wenn eine Störung in der Fettaufnahme durch die Körperzellen vorliegt, dann muß sich bei der Avitaminose das in *einer alimentären Lipämie* (Petrolätherextrakt) zeigen.

Das ist der Fall nach unseren Versuchen. Der Blutfettgehalt eines mit avitaminöser Nahrung gleichmäßig gefütterten Tieres, immer 12 Stunden nach der letzten Fütterung bestimmt, also im nüchternen Zustande des Tieres untersucht, zeigt nun einen sehr charakteristischen Verlauf, der eine große Ähnlichkeit hat mit dem Verlauf der Blutreduktionskurve unter den gleichen Bedingungen. In dem *Anfangsstadium der Avitaminose, in dem meist eine beträchtliche Senkung des Körpergewichtes noch nicht stattfindet, ja manchmal sogar noch Körpergewichtszunahmen notiert werden, sinkt der normale Blutfettgehalt genau wie der Blutzucker* (*Collazo*). Vielleicht haben wir es bei diesem Phänomen mit einer *Kompensationserscheinung* zu tun, indem ein gesteigertes Nahrungsbedürfnis der Zelle infolge einer Dissimilationserhöhung sich einstellt. Die Aufnahmefähigkeit der Zellen für die Nahrungsstoffe braucht in diesem Frühstadium ja noch nicht gestört zu sein. An dieses Stadium der Senkung des Blutfettgehaltes schließt sich dann das Stadium der Hyperlipämie an. Die Nüchternwerte für *Blutfett* steigen stark an, erreichen einige Wochen — in meinen Versuchen 2 bis 4 Wochen — *vor dem Tode einen Höhepunkt und fallen dann wieder rapide ab, ohne aber bei Todeseintritt den Normalwert erreicht zu haben* (Abb. 1). In dem hyperlipämischen Stadium mit aufsteigendem Kurvenschenkel, in dem wir auch unsere Versuche über die alimentäre Hyperlipämie anstellten, muß wohl das Nahrungsfett *verzögert von den Zellen aufgenommen werden.* Dazu wird sich die verstärkte Einschmelzung der Fettdepots gesellen; denn in dieser Zeit nimmt ja auch das Körpergewicht der Tiere schnell ab. Dann kommt aber eine Zeit, in der die Depots sich allmählich erschöpfen, *dann erhält das Blut nur noch Fett aus der Nahrung, zu dem sich vielleicht noch Fett aus in dieser Zeit in verstärktem Maße degenerierenden und zerfallenden Körperzellen zugesellt.*

Der Fettgehalt des Blutes muß mit der Erschöpfung der Fettdepots allmählich sinken, aber er wird wegen der verzögerten Aufnahme durch die Körperzellen und des aus dem Zellzerfall stammenden Fettes doch übernormale Werte aufweisen. So erklärt sich der absteigende Schenkel der lipämischen Kurve und die mäßige Hyperlipämie bei Todeseintritt.

Wenn diese Erklärung richtig ist, dann muß der *Totalfettgehalt des Körpers trotz der vorhandenen Hyperlipämie natürlich stark subnormal*



Diese Abb. 1 ist gewonnen aus den Beobachtungen am avitaminösen Hund Nr. 1. (Siehe Versuchsprotokolle.) Die Abbildung zeigt die Veränderungen des Blutfettgehaltes Proz.-Gehalt des Fettes auf das frische Blut berechnet) während des Verlaufs der ganzen Krankheit bis zum Tode des Tieres an. In den vier ersten Wochen der Avitaminose besteht eine leichte Hypolipämie. Dann folgt bis zur 12. Woche eine immer fortschreitend sich verstärkende Hyperlipämie. Darauf sinkt der Blutfettgehalt kontinuierlich bis zum Tode des Tieres, ohne aber den Normalwert am Todestage wieder erreicht zu haben. Wie aus den Versuchsprotokollen ersichtlich ist, zeigen die Meerschweinchen dasselbe Verhalten hinsichtlich des Blutfettgehaltes im Verlauf der Avitaminose.

sein. Das zeigen auch in evidenter Weise die Versuche *Asadas* aus dem hiesigen Laboratorium (l. c.). *Nun wurden bei diesen ganzen Ausführungen die Kohlehydrate der Nahrung als Fettquellen unberücksichtigt gelassen.* Aus den *Asada*schen Versuchen ergibt sich, daß entweder im avitaminösen Körper die Fettbildung aus Kohlehydrat herabgesetzt ist, oder daß das aus Kohlehydrat gebildete Fett sofort wieder zerstört wird, *daß es jedenfalls zu einer Fettanreicherung des gesamten Körpers bei Kohlehydratfütterung nicht kommt.* Ob nun die Kohlehydrate als Fettquellen einen Einfluß auf den Blutfettgehalt haben, läßt sich dabei nicht mit Sicherheit entscheiden. Wenn Fett aus Kohlehydrat noch in den späteren Stadien der Avitaminose gebildet würde, so könnte auch dadurch natürlich der Blutfettgehalt vermehrt werden.

Wir haben nun gleichzeitig bei diesen Versuchen mit der Bestimmung des *Petrolätherextraktes* auch einige Komponenten desselben isoliert

bestimmt, nämlich *Neutralfett* und *Cholesterin*. Ferner haben wir den Alkoholextrakt des Blutes, Cholesterinester und Phosphatide untersucht. Alle diese Kurven verlaufen im großen und ganzen parallel mit den Kurven für den *Petrolätherextrakt*; das gilt auch für unsere Versuche über die *alimentäre Hyperlipämie*, in denen wir den nüchternen Tieren unter anderem *60 g Schweineschmalz*, also ein Fett gaben, das praktisch kaum Cholesterin und Phosphatide enthält.

Wir haben ferner bei den Versuchen auch noch den Alkoholextrakt in seine Komponenten, in die Cholesterinester- und in die Phosphatidfraktion zerlegt. Dabei fand sich nun, daß die Cholesterinesterkurve mit den anderen Kurven parallel geht, daß aber die Phosphatidkurve keine Veränderung zeigt oder gelegentlich eher zu einem umgekehrten Verlauf zu neigen scheint.

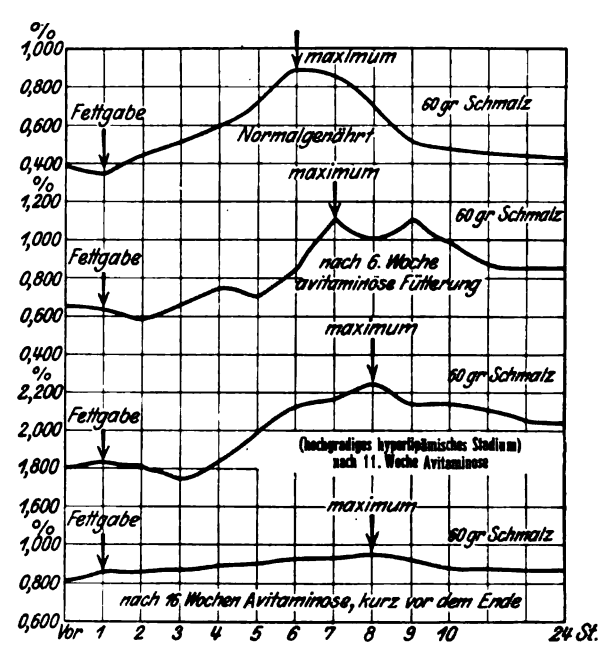
Zu dem Cholesterinstoffwechsel bei Avitaminose ist zu sagen, daß *Lawaczek* (10) und *Hotta* (10a) nicht nur den Cholesteringehalt des Blutes, sondern auch den der Skelettmuskulatur bei Reistauben vermehrt fanden. Wir halten es aber durchaus für möglich, daß die Cholesterinvermehrung im Muskel durch das in den Muskel eingeschlossene cholesterinreiche Blut zustande kommt. Denn an sich verarmt bei der Avitaminose der Gesamtkörper an Cholesterin und Fett, wie *Asada* (8) nachwies, und es sah auch *Stepp* (11) in der Galle eines avitaminösen Hundes das Cholesterin abnehmen. *Iwa-Buchi* (12) fand eine Lipoidverarmung in der Mitte der Nebennierenrinde.

Eine Deutung der Beobachtungen über das Verhalten des Cholesterins bei der Avitaminose zu geben, ist zurzeit kaum möglich, da wir zu wenig über den Cholesterinstoffwechsel in der Norm orientiert sind. Es zeigt sich eben auch hier, daß die *Cholesterinveränderungen mit den Fettveränderungen parallel gehen.*

Hinsichtlich der *Phosphatide* ist folgendes zu sagen, daß nach unseren Versuchen in den späteren Stadien der Avitaminose der Phosphatidgehalt des Blutes manchmal eine Neigung zur Verminderung aufweist, aber er kann auch normal bleiben. Über den Phosphatidgehalt des avitaminösen Körpers wissen wir aus einer Arbeit von *Ciaccio* (13), daß bei beriberikranken Tauben derselbe in der Muskulatur ebenfalls gelegentlich vermindert sein kann. Andererseits fand *Morinacka* (14) im hiesigen Laboratorium, daß nach Fütterung mit Lecithin oder anorganischem Phosphor der Gesamtphosphorgehalt der Asche in der Leber avitaminöser Tiere normal bleiben kann. *Naito* (15) fand dagegen, auf die frische Substanz berechnet, in unserem Laboratorium bei der Avitaminose den Kephalin- und Lecithingehalt des Gehirns zwar normal, aber den *Lecithingehalt der Leber trotz forcierter Lecithinfütterung geringer im Vergleich zu entsprechend ernährten Kontrolltieren, deren Nahrung vitaminreich war und bei denen wahrscheinlich eine Anreicherung der Leber mit Lecithin stattgefunden hatte.*

Aus alledem geht somit hervor, daß der Phosphorstoffwechsel bei der Avitaminose noch ungeklärt ist.

Zum Schluß weise ich noch darauf hin, daß alle unsere Analysenzahlen auf das frische Blut und nicht auf die Bluttrockensubstanz berechnet sind. Bei den großen Differenzen und Ausschlägen, die bei



Diese Abb. 2 ist von dem avitaminösen Hunde Nr. 1 gewonnen, von dem auch die Abb. 1 stammt. Während die Abb. 1 den Blutfettgehalt (Petrolätherextrakt) des nüchternen Tieres jeweils 12 Stunden nach der letzten Fütterung mit der gemischten avitaminösen Nahrung angibt, zeigt die Abb. 2 in einstündlichen Intervallen den Blutfettgehalt nach der Gabe von 60 g Schweineschmalz per os an. 12 Stunden vor der Schmalzgabe hatte das Tier die letzte Fütterung mit der avitaminösen, gemischten Nahrung erhalten. Eine Stunde vor der Schmalzgabe war beim nüchternen Tiere der Blutfettgehalt bestimmt worden. Die Versuche wurden immer in der gleichen Weise in verschiedenen Stadien der Avitaminose gemacht. Einmal wurde auch ein solcher Versuch zur Kontrolle in der Zeit gemacht, als das Tier noch vitaminhaltiges Futter bekam. Aus einem Vergleich der Einzelkurven dieser Abb. 2 geht hervor, daß mit der fortschreitenden Avitaminose das Maximum der Blutfettvermehrung nach einmaliger Fettfütterung mehr und mehr verspätet auftritt (verzögerte Resorption) und daß es länger dauert, bis der Anfangswert wieder erreicht ist.

unseren Analysen zutage treten, ist es wohl unwahrscheinlich, daß sich die Ergebnisse bei der Berechnung auf die Bluttrockensubstanz wesentlich ändern würden, da im Verlaufe der Avitaminose nach *Palmer* und *Hoffmann* (17), wie *Alpern* (18) das Blut um etwa 4 Proz. wasserreicher wird, ich aber immer eine starke Erhöhung des Fettgehaltes usw. fand.

1. Im Verlaufe der Avitaminose stellt sich eine Vermehrung des gesamten Blutfettgehaltes ein, die gegen Ende der Krankheit wieder abnimmt, ohne daß der normale Blutfettwert erreicht wird (Abb. 1).

2. Nach einer einmaligen größeren Fettzufuhr per os bleibt der Blutfettgehalt bedeutend längere Zeit bei der Avitaminose über den Nüchternwert erhöht als im Normalzustande unter entsprechenden Bedingungen (Abb. 2).

3. Mit den Totalfettwerten des Blutes gehen parallel die Werte für den Cholesteringehalt.

4. Der Phosphatidgehalt des Blutes ist bei der Avitaminose zunächst normal, in den späteren Stadien der Krankheit aber kann er manchmal etwas vermindert sein.

Versuchsanordnung.

Unsere avitaminösen Hunde wurden mit einem an allen vitaminfaktorenfreien Futter gefüttert:

50 g gepulvertem vitaminfreien Pferdefleisch.
50 g Reis.
30 g Schmalz.
3 g Salzgemisch und beliebig Wasser.

Die Meerschweinchen erhielten trockenen Hafer + Salzgemisch + Wasser, hatten also ein an allen Vitaminen armes Futter.

Die Blutentnahme wurde in nüchternem Zustande etwa 12 Stunden nach der letzten Nahrungsaufnahme gemacht. In der Woche *vor* den Versuchen wurde dieselbe Nahrung verabfolgt mit Zugabe von Butter, Citronensaft und Backhefe (Faktoren A, B, C). Das Blutfett wurde nach der *Bang*schen Mikromethode ermittelt. Wie bei den anderen Mikromethoden, mit denen wir schon lange arbeiteten, kann man nur ganz reine, frische Lösungen verwenden, die untereinander kontrolliert werden müssen. Außerdem müssen sie mit fettfreien Extraktionslösungen (d. h. Petroläther und Alkohol) mehrmals destilliert werden; ebenso gilt dies für das Wasser.

Wir haben keine Verdampfung des Äthers oder Alkohols durch Destillation vorgenommen, sondern durch Wasser- oder Sandbad ihn in der Luft sich verflüchtigen lassen. So konnten wir mehrere Bestimmungen gleichzeitig vornehmen. Das Blut wurde immer der Ohrvene entnommen.

Literatur.

1) *Bickel*, Klin. Wochenschr. **3**, 1922. — 2) *Tsuji*, diese Zeitschr. **129**, 1922. — 3) *Collazo*, ebendaselbst **136**, 1923. — 4) *Miyadera*, ebendaselbst **130**, 1922. — 5) *Morinaka*, ebendaselbst **133**, 1922. — 6) *Yoshiue*, ebendaselbst **134**, 1922. — 7) *Haramaki*, ebendaselbst **134**, 1922. — 8) *Asada*, Erscheint in dieser Zeitschr. 1923. — 9) *Collazo*, diese Zeitschr. **134**, 1922. — 10) *Lawaczek*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **125**, 1923. — 10a) *Hotta*, ebendaselbst **128**, 1923. — 11) *Stepp*, Zeitschr. f. Biol. **69**, 514, 1919. — 12) *Iwa-Buche*, Beitr. z. path. Anat. u. z. allg. Path. **70**, 1922. — 13) *Ciaccio*, Arch. di Farm. sperim. e Science affini **24**, 1917. — 14) *Morinacka*, Nach dem Manuskript zitiert. — 15) *Naito*, erscheint in dieser Zeitschr. 1923. — 16) *Ogata*, Jap. med. Wochenschr. 1922 (japanische Sprache). — 17) *L. Palmer* und *Clara Hoffmann*, Procud. of the soc. of exper. biol. a. medic **20**, 1922; in d. Ber. f. d. ges. Physiol. **19**, H. 1/2 1923. — 18) *Alpern*, diese Zeitschr. **138**, 1923.

Versuchsprotokolle.

Dauer der avitaminösen Fütterung in Wochen, in denen an 2 bis 4 verschiedenen Tagen die in den dazugehörigen seitlichen Rubriken befindlichen Analysen ausgeführt wurden.	1. Petrolätherextrakt Proz.	2. Alkoholextrakt Proz.	3. Gesamtfett (Petrolätherextrakt + Alkoholextrakt) Proz.	4. Cholesterin Proz.	5. Neutralfett Proz.	6. Cholesterinester Proz.	7. Phosphatide Proz.	8. Körpergewicht g
Hund Nr. 1.								
Woche vor Beginn der avitaminösen Fütterung . . .	0,389 0,407 0,391 0,389	0,412 0,419 — 0,439	0,852	0,275 0,291 0,300 0,279	0,114 0,116 0,091 0,110	0,361 0,369 — 0,379	0,076 0,075 — 0,090	13.000
1. Woche	0,397 0,371	0,401 0,400	0,784	0,290 0,272	0,107 0,099	0,350 0,353	0,076 0,070	12,950
2. „	0,287 0,259	0,301 0,325	0,586	0,212 0,166	0,075 0,093	0,263 0,290	0,057 0,052	12,900
3. „	0,247 0,256	0,307 0,246	0,528	0,160 0,183	0,087 0,073	0,276 0,201	0,046 0,067	13.000
4. „	0,361 0,369	0,297 0,320	0,673	0,264 0,276	0,097 0,093	0,253 0,297	0,066 0,034	12,700
5. „	0,370 0,401	0,250 0,431	0,776	0,280 0,315	0,090 0,086	0,301 0,389	0,088 0,063	12,500
6. „	0,767 —	0,689 —	1,466	0,626 —	0,141 —	0,612 —	0,115 —	12,400
7. „	1,189 1,170	0,979 0,999	2,168	0,668 0,544	0,521 0,626	0,910 0,916	0,103 0,124	12,200
8. „	1,600 1,459	1,386 1,500	2,972	1,000 0,807	0,600 0,602	1,298 1,409	0,132 0,136	12,000
9. „	1,507 1,510	1,400 —	2,907	0,917 0,911	0,590 0,599	1,302 —	0,147 —	11,900
10. „	1,903 —	1,600 —	2,503	1,027 —	0,876 —	1,527 —	0,109 —	11,000
11. „	2,360 —	1,946 —	4,206	1,427 —	0,933 —	1,890 —	0,084 —	11,100
12. „	2,410 2,391	1,989 2,007	4,398	1,329 1,255	1,081 1,036	1,920 1,936	0,103 0,106	10,700
13. „	2,100 2,020	2,006 —	4,106	0,970 0,890	1,130 1,130	1,939 —	0,100 —	10,100
14. „	1,312 —	1,250 —	2,562	0,533 —	0,779 —	1,183 —	0,100 —	9,500
15. „	1,207 1,181	1,200 —	2,407	0,514 0,565	0,693 0,616	1,115 —	0,113 —	9,000
16. „	0,803 —	0,783 —	1,586	0,463 —	0,340 —	0,753 —	0,045 —	8,200

Dauer der avitaminösen Fütterung in Wochen, in denen an 2 bis 4 verschiedenen Tagen die in den dazugehörigen seitlichen Rubriken befindlichen Analysen ausgeführt wurden.	1. Petrolätherextrakt Proz.	2. Alkoholextrakt Proz.	3. Gesamtfett (Petrolätherextrakt + Alkoholextrakt Proz.	4. Cholesterin Proz.	5. Neutralfett Proz.	6. Cholesterinester Proz.	7. Phosphatide Proz.	8. Körpergewicht g
Hund Nr. 2.								
Woche vor Beginn der avitaminösen Fütterung . . .	0,496 0,503	0,560 0,543	1,051	0,386 0,400	0,110 0,103	0,468 0,453	0,138 0,135	9,000
1. Woche	0,501 0,540	0,571 0,568	1,095	0,402 0,429	0,101 0,111	0,483 0,478	0,132 0,135	9,300
2. „	0,486 0,456	0,500 0,507	0,974	0,396 0,378	0,090 0,076	0,400 0,403	0,150 0,156	9,000
3. „	0,411 0,368	0,407 0,409	0,797	0,316 0,278	0,095 0,090	0,316 0,316	0,136 0,139	8,700
4. „	0,286 0,273	0,360 0,329	0,624	0,200 0,193	0,086 0,080	0,270 0,230	0,135 0,148	8,200
5. „	0,356 0,346	0,346 0,307	0,677	0,250 0,256	0,106 0,090	0,260 0,229	0,129 0,117	7,900
6. „	0,328 —	0,300 —	0,628	0,628 —	0,100 —	0,216 —	0,126 —	7,800
Hund Nr. 3.								
Woche vor Beginn der avitaminösen Fütterung . . .	0,429 0,367 0,536	0,329 0,243 0,339	0,781	0,293 0,263 0,407	0,136 0,104 0,129	0,212 0,142 0,265	0,175 0,151 0,111	10,000
1. Woche	0,520 0,469	0,399 0,364	0,876	0,420 —	0,100 —	0,278 0,301	0,181 0,095	10,500
2. „	0,369 0,371	— 0,261	0,632	— —	— —	— —	— —	10,000
3. „	0,206 0,220	0,293 0,227	0,473	0,130 —	0,076 —	0,230 0,164	0,094 0,094	9,800
4. „	0,196 0,231	0,112 0,203	0,371	0,110 0,147	0,086 0,084	0,051 0,143	0,091 0,090	9,600
5. „	0,396 0,431	0,221 0,393	0,721	0,271 0,320	0,125 0,111	0,146 0,317	0,112 0,114	9,000
6. „	0,690 0,603	0,307 0,410	1,005	0,550 0,573	0,140 0,130	0,265 0,395	0,063 0,022	8,700
„	0,612 0,693	0,390 0,403	1,049	0,482 0,390	0,130 0,303	0,332 0,312	0,087 0,136	8,200
„	0,781 0,797	0,529 0,507	1,307	0,370 —	0,411 —	0,483 0,496	0,061 0,016	8,000
„	1,400 1,190	0,830 0,860	2,140	0,780 —	0,620 —	0,781 0,814	0,073 0,069	7,400
„	0,910 0,830	0,900 0,760	1,700	0,470 0,437	0,440 0,393	0,976 0,747	0,051 0,019	7,000
„	0,720 0,800	0,533 0,514	1,283	0,330 0,301	0,390 0,499	0,481 0,472	0,051 0,063	6,700
„	0,639 0,601	0,394 0,360	0,997	0,356 0,348	0,281 0,253	0,339 0,315	0,082 0,067	6,300

Dauer der avitaminösen Fütterung in Wochen, in denen an 2 bis 4 verschiedenen Tagen die in den dazugehörigen seitlichen Rubriken befindlichen Analysen ausgeführt wurden.	1. Petrolätherextrakt Proz.	2. Alkoholextrakt Proz.	3. Gesamtfett (Petrolätherextrakt + Alkoholextrakt) Proz.	4. Cholesterin Proz.	5. Neutralfett Proz.	6. Cholesterinester Proz.	7. Phosphatide Proz.	8. Körpergewicht g
Hunger-Hund Nr. 4 (vorher vitaminreich gefüttert).								
Woche vor dem Hungerzustande	0,396 0,424	0,403 0,418	0,820	0,286 0,300	0,110 0,124	0,315 0,328	0,132 0,135	9,000
1. Woche des Hungerzustandes	0,412 0,300	0,415 0,327	0,727	0,320 0,220	0,092 0,080	0,330 0,333	0,127 0,159	9,150
2. " des Hungerzustandes	0,251 0,196	0,193 0,189	0,414	0,100 0,138	0,051 0,108	0,118 0,120	0,112 0,103	7,900
3. " des Hungerzustandes	0,319 0,406	0,300 0,395	0,710	0,216 0,300	0,103 0,106	0,216 0,301	0,126 0,141	7,200
4. " des Hungerzustandes	0,458 0,593	0,501 0,590	1,370	0,348 0,486	0,110 0,107	0,409 0,500	0,138 0,135	6,200
Meerschweinchen Nr. 1.								
Woche vor Beginn der avitaminösen Fütterung . . .	0,321	0,300	0,621	0,150	0,179	—	—	600
1. Woche	0,300	0,263	0,563	—	—	—	—	550
2. "	0,401	0,320	0,720	—	—	—	—	500
4. "	0,290	0,380	0,670	0,120	0,170	—	—	400
Meerschweinchen Nr. 2.								
Woche vor Beginn der avitaminösen Fütterung . . .	0,350	0,297	0,647	—	—	—	—	600
1. Woche	0,229	0,200	0,429	—	—	—	—	560
3. "	0,420	0,306	0,726	—	—	—	—	450
Meerschweinchen Nr. 3.								
Woche vor Beginn der avitaminösen Fütterung . . .	0,401	0,316	0,717	0,250	0,156	—	—	650
2. Woche	0,461	0,320	0,781	0,300	0,163	—	—	600
4. "	0,497	0,333	0,830	0,286	0,219	—	—	420

Über das Hormon (Geschlechtsstoff) der Placenta und des Corpus luteum, sowie die Lipoide des Corpus luteum.

Von

Sigmund Fränkel und **Maria Fonda.**

(Aus dem Laboratorium der *Ludwig-Spiegler*-Stiftung in Wien.)

(Eingegangen am 30. Januar 1923.)

In einer Arbeit aus diesem Laboratorium hat *E. Herrmann*[1]) zeigen können, daß aus der Placenta nach ihrer Entblutung eine lipoide, stickstoff- und phosphorfreie Substanz gewinnbar ist, welche im Tierversuch einen mächtigen entwicklungsfördernden Einfluß auf das gesamte Genitale des weiblichen Tieres, und zwar auf die Vulva, Vagina, Uterus, Tuben und Ovarien, ebenso aber eine große Entwicklungsförderung auf die Brustdrüsenapparate beider Geschlechter hat. Diese Substanz bewirkt, daß sich jugendliche unentwickelte Kaninchen im Verlauf weniger Tage zur Vollreife entwickeln und sorgt für die anatomische Integrität des Genitalapparates und der Brustdrüsen, sowie für deren physiologische Entwicklung: Brunst und Gravidität. Sie hat weiterhin einen mächtigen Einfluß auf die Ausgestaltung spezifischer Geschlechtscharaktere; sie ist als Reizstoff, und zwar als das Hormon, welches von der Placenta bzw. vom Ovar als Inkret sezerniert wird, anzusehen.

Das Verfahren von *S. Fränkel* und *E. Herrmann*, wie es in der genannten Arbeit und in den beiden Patentschriften von *S. Fränkel* und *E. Herrmann*[2]) beschrieben ist, beruht darauf, daß man Placenta bzw. Ovar mit der Fleischmaschine zerkleinert, hierauf im Vakuum bei 37° trocknet und die so gewonnene Masse auf einer Seckmühle fein zermahlt und dann im Soxhletapparat mit Äther erschöpfend extrahiert. Die ätherische Lösung wird abdestilliert und der Rückstand mit der mehrfachen Menge Aceton gut durchgerieben. Durch erschöpfende Behandlung mit Aceton kann man alle wirksame Substanz in Lösung bekommen; man engt die acetonige Lösung ein und kühlt

---

[1]) Monatsschr. f. Geburtsh. u. Gynäkol. **41**, 1, 1915.

[2]) D. R. P. Kl. 12_0, Nr. 309482 vom 14. Juli 1914 und Nr. 309606 vom 31. Januar 1914.

sie stark ab. Es kristallisiert in größerer Menge Cholesterin, vermischt mit Cholesterinestern, aus. Die Mutterlauge wird eingeengt, mit 96proz. Alkohol aufgenommen und die alkoholische Lösung stark gekühlt, wobei wieder Cholesterin auskristallisiert. Man filtriert die Kristalle ab, engt die Mutterlauge neuerlich ein, nimmt mit Methylalkohol auf, kühlt, wobei sich in öliger Form Neutralfett abscheidet. Die vom Öl befreite methylalkoholische Mutterlauge engt man ein, holt sie mit kaltem, absolutem Alkohol aus und trennt sie von dem unlöslichen Sirup ab. Die alkoholische Lösung wird abdestilliert, der Rückstand von ausgeschiedenen kristallisierten Substanzen befreit, im Vakuum konzentriert und das Öl der Destillation im absoluten Vakuum unterworfen.

Bei dieser Destillation im Vakuum erhielt *E. Herrmann* drei Fraktionen: einen Vorlauf, der bei 177° Innentemperatur überging, sofort auskristallisierte und nach dem Umkristallisieren bei 77° schmolz und sich als Cholesterylpalmitat erwies; einen Mittellauf bei 193° Innentemperatur und 240° Badtemperatur (unkorrigiert), bei einem Druck von 0,06 mm Hg. Dieser dickflüssige Mittellauf gab, mit 95proz. Alkohol aufgenommen, eine Cholesterinausscheidung. Die eingeengte Mutterlauge wird nun refraktioniert. Die so erhaltene Substanz war ein dickflüssiges Öl und gab die charakteristischen Reaktionen des Cholesterins, ohne daß aus dieser Substanz Cholesterin darstellbar wäre. Die Substanz bräunt sich bei längerem Stehen an der Luft. Ihre Elementaranalysen ergaben:

C . . . . 81,33 bis 81,62%
H . . . . 11,32 „ 11,49%

Herrmann ist aber zur Aufstellung einer Formel und zur Darstellung von Derivaten nicht gelangt.

Wir haben die von *Herrmann* aus Placenta dargestellte Substanz, sowie den Chloroformextrakt aus Corpus luteum gleichzeitig untersucht. In der Voraussetzung, daß der Chloroformextrakt des Corpus luteum ebenso ein Gemenge von Lipoiden ist wie der aus den anderen Organen mit organischen Lösungsmitteln gewonnene Extrakt, haben wir es nun unternommen, vorerst nach der im hiesigen Laboratorium ausgearbeiteten Methode, die einzelnen Gruppen der Lipoide zu isolieren.

Wir haben, um die Frage nach dem Hormon der Placenta und des Corpus luteum zu lösen, sowohl aus Placenta als auch aus Corpus luteum auf diese Weise einen Stoff gewonnen, dessen Eigenschaften mit den von *E. Herrmann* beschriebenen identisch sind und der nun so rein dargestellt wurde, ebenso seine Derivate, daß es möglich war, eine Bruttoformel aufzustellen, das Molekulargewicht zu bestimmen und die Anzahl und die Rolle der Sauerstoffatome aufzuklären, sowie den ungesättigten Charakter der Substanz festzustellen.

Die Methode der Gewinnung des Lipoidextraktes war identisch mit der in der *E. Herrmann*schen Arbeit beschriebenen. Das Lipoidgemenge aus dem Corpus luteum, eine dunkelbraune, zähflüssige Substanz, wurde mehrmals mit Äther aufgenommen und vom Rückstand (weiße Materie) zentrifugiert. Der Ätherextrakt, welcher beim Stehen eine lichtgelbe Substanz ausschied, wurde von dieser durch Zentrifugieren getrennt, stark eingeengt, dann mit Aceton erschöpfend ausgeholt, und auf diese Weise wurden alle in Aceton löslichen und in Aceton unlöslichen Verbindungen voneinander getrennt.

Ätherunlösliche Verbindungen.

Weiße Materie. Die weiße Materie wurde im Soxhletapparat mit Äther erschöpfend extrahiert. Der Extrakt wurde mit dem Hauptextrakt vereinigt. Die Substanz hatte den Schmelzpunkt 180 bis 200°, enthielt Phosphor, Schwefel und Stickstoff und wurde vorläufig nicht weiter in ihre Bestandteile zerlegt.

Die aus dem ätherischen Extrakt ausgeschiedene Substanz wurde aus heißem Aceton umkristallisiert, von einer rotbraunen, klebrigen Substanz dekantiert, die mit der Acetonfällung vereinigt wurde. Die Substanz zeigte den Schmelzpunkt 57 bis 69° und gab keine Cholesterinreaktion. Bei weiterem Umkristallisieren aus Aceton zeigte der Schmelzpunkt das gleiche weite Intervall. Aus Alkohol, mehrmals umkristallisiert, schied sich aus der alkoholischen Lösung ein gelbes Öl ab, und es wurde davon dekantiert. Dieses Öl kristallisierte aus wenig heißem Aceton als eine weiße Substanz. Diese wurde zweimal umkristallisiert und zeigte den Schmelzpunkt 65°. Sie enthielt weder Stickstoff noch Phosphor, beim Erhitzen mit Borsäureanhydrid wurde Akroleinbildung konstatiert, so daß ein Glycerinfett vorlag, und zwar Glycerintripalmitat. Sie wurde mit Natriumäthylat in alkoholischer Lösung verseift; die Fettsäure wurde durch Salzsäure in Freiheit gesetzt und mit Äther aufgenommen. Dieser wurde abgetrennt und verdunstet; die resultierende Fettsäure wurde nochmals aus Aceton umkristallisiert und zeigte den Schmelzpunkt 62°.

Das Lithiumsalz ergab: 0,0859 g Substanz, mit Schwefelsäure abgeraucht, gaben 0,01752 g Lithiumsulfat, entsprechend 2,57 % Lithium. Berechnet für Lithiumpalmitat 2,64 %.

Aus der alkoholischen Lösung kristallisierte in Kugeln (aus Aceton in Nadeln) eine Substanz vom Schmelzpunkt 81 bis 87°, in Äther zum Teil löslich, zum Teil quellbar; von der ätherischen Lösung getrennt, aus Alkohol und Aceton umkristallisiert, zeigte sie den Schmelzpunkt 84 bis 86° konstant. Sie ist stickstoff- und phosphorhaltig; die Reaktion mit Orcin und Salzsäure auf Galaktose ist positiv. Weiter wurde sie nicht analysiert.

Acetonfällung.

Die Acetonfällung wurde mit absolutem Alkohol gut umgerührt; die alkoholische Lösung wurde dekantiert und der Niederschlag wiederholt mit absolutem Alkohol behandelt, bis dieser fast farblos ablief. Die alkoholische Lösung wurde mit einer schwach ammoniakalischen Bleiacetatlösung gefällt. Das Filtrat wurde so lange mit Schwefelsäure versetzt, bis sich Kongopapier eben schwach blau färbte, dann vom Bleisulfatniederschlag abfiltriert.

Kephalinfraktion. Der Rückstand der Acetonfällung, welcher erfahrungsgemäß immer noch „weiße Materie" enthält, wurde in Äther gelöst und nach einigem Stehen in der Kälte zentrifugiert, bis der Äther klar blieb. Die ätherische Lösung wurde nach dem Einengen mit Alkohol gefällt; der Niederschlag wurde mit Alkohol mehrmals angerieben und dekantiert, wieder in Äther gelöst, wieder zentrifugiert und wieder mit Alkohol gefällt, bis man mit Äther eine klare Lösung bekam, die sich beim Stehen nicht mehr trübte. Diese wurde mit Alkohol gefällt; das Filtrat eingeengt und mit Alkohol wieder versetzt, worauf sich wieder eine stickstoff- und phosphorhaltige Substanz als weiche Masse ausschied. Diese Fällungen wurden zur Reinigung nach *S. Fränkel* und *E. Neubauer*[1]) in Wasser emulgiert und in einer Reibschale gut verrieben. Die Emulsion wurde zentrifugiert, vom Unlöslichen dekantiert und mit Salzsäure gefällt; die Fällung mit Äther aufgenommen, mit Alkohol gefällt und mit Aceton gewaschen. Das trockene Präparat wurde analysiert.

Die Mikroanalyse des Phosphors nach *Hans Lieb* gibt:

5,46 mg geben 0,215 mg P, das ist 3,91% P.

6,71 mg geben 0,103 ccm N bei 23° C und 746 mm Hg, entsprechend 1,73% N. Relation von Phosphor zu Stickstoff wie 1 : 1.

Die Substanz ist also ein Monoaminomonophosphatid, und zwar Kephalin.

Die ätherisch-alkoholischen Filtrate von der Kephalinfällung wurden nun im Vakuum stark eingeengt und mit einer ammoniakalischen Bleiacetatlösung gefällt. Diese phosphor- und stickstoffhaltige Fällung vereinigten wir mit der Bleifällung aus dem alkoholischen Extrakt der Acetonfällung (s. o.) und extrahierten sie mit Äther. Der phosphor- und stickstoffhaltige Rückstand wurde nicht weiter bearbeitet. Der ätherische Extrakt, mit absolutem Alkohol gefällt, gab einen geringen Niederschlag, der nach *S. Fränkel* und *Kafka*[2]) durch wiederholtes Auflösen in heißem Benzol und Fällen mit absolutem Alkohol bis zur restlosen Löslichkeit in Benzol und Äther gereinigt wurde. Diese Verbindung ergab positive Zuckerreaktion.

---

[1]) Diese Zeitschr. **21**, 321, 1909.

[2]) Ebendaselbst **101**, 159, 1920.

Der Körper ist also der Dilignoceryl-N- diglykosaminmonophosphorsäureester.

Lecithinfraktion. Das Filtrat wurde so lange mit Schwefelsäure versetzt, bis sich Kongopapier eben schwach blau färbte; dann vom Bleisulfatniederschlag abfiltriert, konzentriert, mit dem Filtrat vom Bleiniederschlag aus dem alkoholischen Extrakt der Acetonfällung vereinigt und mit Aceton gefällt, wieder eingeengt und mit Aceton gefällt, bis keine Ausscheidung mehr erfolgte. Die so gewonnenen, dunkelrot gefärbten weichen Niederschläge wurden in Alkohol gelöst und mit 10proz. alkoholischer Chlorcadmiumlösung gefällt. Der Niederschlag wurde dann in heißem Toluol aufgelöst, vom ungelösten Rückstand getrennt und mit absolutem Alkohol gefällt; dieser Vorgang wurde viermal wiederholt, bis sich die alkoholische Fällung nach dem Trocknen in Toluol klar und ohne Rückstand löste. Die so erhaltene Lecithinchlorcadmiumverbindung schmolz bei 196° und gab folgende Analysenresultate:

7,245 mg geben 0,104 ccm N bei 24° *t* und 746 mm Hg, entsprechend 1,62 % N.

6,135 mg geben 0,215 mg P, das ist 3,42 % P.

Das Verhältnis Phosphor : Stickstoff ist 1 : 1. Es handelt sich hier also um das Monoaminophosphatid Lecithin.

Der in Toluol unlösliche Rückstand ist phosphor- und stickstoffhaltig. Er wurde nicht weiter analysiert.

Das acetonige Filtrat war nach dem Abscheiden des Lecithins immer noch phosphor- und stickstoffhaltig. Es wurde mit Bleiacetat gefällt und in der üblichen Weise gereinigt. Diese Fällung war phosphor- und stickstofffrei. Sie wurde mit Wasser geschüttelt, mit Schwefelsäure versetzt, bis das Wasser saure Reaktion zeigte, dann mit Äther ausgeholt; die ätherische Lösung wurde mit Wasser gewaschen. Nach dem Abdestillieren des Äthers zeigte die Analyse des Rückstandes, daß er aus Cholesterin und Neutralfett bestand.

Obwohl das eingeengte Filtrat der Bleiacetatfällung mit Aceton aufgenommen wurde, verblieb im Aceton eine phosphor- und stickstoffhaltige Substanz, welche weder mit alkoholischer Chlorcadmiumlösung noch mit Sublimatlösung eine Fällung gab. Eingeengt, mit Äther aufgenommen, schied sich eine ölige Schicht ab, welche phosphor- und sehr stark stickstoffhaltig war und in Aceton bis zu einem geringen Rest in Lösung ging.

Nach dem Abdestillieren des Äthers blieb als Rückstand ein Öl, das intensive Cholesterinreaktion zeigte, doch wurde weder Cholesterin noch Cholesterinester ausgeschieden. Dieses Öl müßte demnach die mit den Phosphatiden übergegangene wirksame Substanz enthalten und wurde mit der Hauptlösung vereinigt.

Acetonfraktion.

Nach der Acetonfällung wurde das ätherische-acetonige Filtrat im Vakuum stark eingeengt. In einer Kältemischung wurde der Rückstand fest. Mit Alkohol behandelt, ging ein Teil in Lösung, dann wurde von einem gelben vaselinähnlichen Rückstand dekantiert. Die alkoholische Lösung, in welcher der Hauptanteil der wirksamen Substanz enthalten sein mußte, schied, stark eingeengt, Kristalle ab, welche aus 85proz. Alkohol umkristallisiert, sich als reines Cholesterin erwiesen. Schmelzpunkt 148°. Auf Zusatz von Aceton gab der gelbe Rückstand beim Stehen eine Kristallausscheidung. Diese hatte positive Cholesterinreaktion.

Myristinsäure. Aus 85proz. Alkohol, wiederholt umkristallisiert, gab diese Fraktion Cholesterin und einen farblosen Körper, welcher sich als reine Myristinsäure erwies. Schmelzpunkt 54°, negative Glycerinreaktion. Das Lithiumsalz gab:

0,1637 g, mit Schwefelsäure abgeraucht, geben 0,038 g Lithiumsulfat.

Gefunden:	Berechnet für Myristinsäure:
2,90% Li	2,96% Li.

Freie Myristinsäure wurde in unserem Laboratorium jüngst auch in der Leber gefunden[1]).

Im acetonigen Filtrat bildete sich beim Stehen eine rötlichgelbe Ölausscheidung, welche, mit Alkohol versetzt, zwei Schichten bildete. Die alkoholische, eingeengte Lösung enthielt Phosphor und Stickstoff und gab mit alkoholischer Chlorcadmiumlösung eine geringe Lecithinfällung; sie wurde mit Wasser zweimal gewaschen, mit Äther aufgenommen und eingeengt. Es kristallisierte wieder Cholesterin aus. Das Filtrat wurde mit der Hauptlösung vereinigt. Das Öl war phosphor- und stickstoffhaltig, gab mit alkoholischer Chlorcadmiumlösung und alkoholischer Sublimatlösung keine Fällung. Es wurde mit Wasser gewaschen, mit Äther aufgenommen und eingeengt. Es war in Aceton löslich, in Alkohol unlöslich, gab starke Cholesterinreaktion und fluoreszierte stark. In wenig Aceton gelöst, schied es in der Kälte eine gelbliche Substanz aus vom Schmelzpunkt 11 bis 19° (im Winter dargestellt) und positiver Cholesterinreaktion. Die Mutterlauge schied abgedampft wieder dieselbe Substanz aus, und so sechsmal, bis das Filtrat wieder eine ölige untere Schicht bildete, die von der oberen acetonigen Lösung getrennt wurde. Die ölige Substanz wurde in einer Kältemischung fest. Sie wurde nicht weiter analysiert. Die festen Ausscheidungen wurden mehrmals aus Aceton umkristallisiert. Der Schmelzpunkt erhöhte sich nur wenig. Sie waren in vielem Alkohol in der Wärme löslich und gaben beim Erkalten eine geringe Kristallausscheidung von Cholesterin, Schmelzpunkt 148°.

[1]) *U. Sammartino*, diese Zeitschr. **132, 343, 1922.**

Aus der alkoholischen Mutterlauge kristallisierten nun fraktioniert zwei Verbindungen aus, welche alle Eigenschaften der Ester des Cholesterins aufwiesen. Diese zeigten nach vielfachem Umkristallisieren den Schmelzpunkt 69 bis 73° und 78 bis 81° konstant. Um die Natur der in den Estern enthaltenen Fettsäuren zu bestimmen, wurden die reinsten Fraktionen mit Natriumäthylat in alkoholischer Lösung verseift. Die alkoholischen Lösungen wurden mit Wasser versetzt, mit Salzsäure neutralisiert und mit Chlorcalcium gefällt. Die Kalkseifen, welche auch das mitfallende Cholesterin enthielten, wurden mit Äther extrahiert; es wurde reines Cholesterin gewonnen. Die Kalkseifen wurden in Wasser verteilt, die Fettsäuren wurden mit Salzsäure in Freiheit gesetzt und mit Äther aufgenommen. Dieser wurde abgetrennt, abdestilliert, und die Fettsäuren wiederholt aus Alkohol und Aceton umkristallisiert, bis sie einen konstanten Schmelzpunkt zeigten. Die eine Fettsäure hatte den Schmelzpunkt 69° (Stearinsäure 69°), die andere den Schmelzpunkt 62° (Palmitinsäure 62,6°).

Die vereinigten und eingeengten alkoholischen Filtrate enthielten Phosphor und Stickstoff, doch gaben sie mit alkoholischer Chlorcadmiumlösung und alkoholischer Sublimatlösung keine Fällung. Nach mehreren Cholesterinausscheidungen wurde die Lösung mit ammoniakalischem Bleiacetat gefällt, von dem weißen Niederschlag abgesaugt, das Filtrat von Blei durch Schwefelsäure befreit, diese dann mit Ammoniak neutralisiert und hierauf eingeengt. Nach wiederholtem längeren Stehen schied sich jedesmal Cholesterin aus. Die stark eingeengte Lösung wurde jetzt mit Methylalkohol versetzt und in eine Kältemischung gestellt. Es entstand eine flockige weiße Fällung. Das Ausfrieren und Filtrieren wurde dreimal wiederholt, bis sich nichts mehr ausschied. Diese Fällungen, in Methylalkohol in der Wärme zum Teil mit rotbrauner Farbe löslich, wurden von einem rotbraunen Sirup dekantiert, der wieder in frischem Methylalkohol zweimal gelöst wurde, bis das Ganze in Lösung ging. Aus der ersteren Lösung schieden sich geringe Mengen von weißen Flocken und kugelförmige Kristallgruppen ab, die sich nach mehrmaligem Umkristallisieren als Fett und Cholesterin erwiesen. Die Kristallausscheidungen der beiden anderen Fraktionen bestehen aus Cholesterin und einer kleinen Menge Schmiere, die den Kristallen anhaftete und nicht entfernt werden konnte. Aus Alkohol, Aceton und Eisessig umkristallisiert, geben diese Cholesterinkristalle den Schmelzpunkt über 127°.

Die im Hochvacuum destillierte Fraktion.

Die methylalkoholische Mutterlauge schied nach dreiwöchigem Stehen vereinzelte Cholesterinkristalle ab, von denen abfiltriert wurde. Die stark eingeengte Lösung wurde nun im Hochvakuum fraktioniert.

Bei 170 bis 185° Badtemperatur, 60 bis 70° Innentemperatur und 0,06 mm Hg Druck ging unter starkem Schäumen eine geringe Menge einer gelben Flüssigkeit von stechendem Geruch über.

Bei 204° Badtemperatur, 154° Innentemperatur und 0,053 mm Hg Druck begann eine gelbe Flüssigkeit zu destillieren, welche bei 212 bis 221° Badtemperatur und 172 bis 178° Innentemperatur schön und regelmäßig destillierte und zum größten Teil kristallisierte.

Bei 225 bis 230° Badtemperatur, 181 bis 182° Innentemperatur und 0,078 mm Hg ging ein etwas dickflüssigeres lichtgelbes Öl über, das auch kristallisierte.

Bei 235 bis 246° Badtemperatur, 194° Innentemperatur und 0,06 mm Hg destillierte ein dickflüssiges lichtgelbes Öl über.

Bei 257° Badtemperatur, 200 bis 206° Innentemperatur und 0,064 mm Hg destillierte ein noch dickflüssigeres Öl über. Der Rückstand wurde nicht weiter analysiert.

Die letzten drei Fraktionen wurden nun vereinigt und refraktioniert. Es ging als erste bei 210 bis 225° Badtemperatur und 176 bis 182° Innentemperatur eine Fraktion über, die zum größten Teil aus Cholesterinester bestand.

Bei 230 bis 240° Badtemperatur, 193,5° Innentemperatur und 0,064 mm Hg destillierte ein dickflüssiges lichtgelbes Öl über, welches nach *Herrmann* die wirksame Substanz enthält, und bei 256° Badtemperatur und 200 bis 210° Innentemperatur ein dickflüssigeres und dunkleres Öl.

Beim Refraktionieren gab der Mittellauf drei Fraktionen: Die erste ging bei 187° Innentemperatur und 0,056 mm Hg über. Sie gab eine geringe Kristallausscheidung.

Die Elementaranalyse gab:

7,255 mg	21,150 mg CO_2	7,055 mg H_2O
4,650 ,,	13,540 ,, ,,	2,610 ,, ,,
	79,53% C	10,91% H
	79,44% ,,	11,10% ,,

Die zweite Fraktion wurde bei 194° Innentemperatur und 0,064 mm Hg abgenommen.

Die Elementaranalyse gab:

6,425 mg	19,30 mg CO_2	6,435 mg H_2O
5,740 ,,	17,230 ,, ,,	5,785 ,, ,,
	81,95% C	11,21% H
	81,86% ,,	11,28% ,,

Daraus berechnet $C_{32}H_{52}O_2$.

Die dritte Fraktion ging bei 210° Innentemperatur und 0,06 mm Hg über. Sie schied beim Auflösen in Alkohol eine weiße Substanz ab.

Die Elementaranalyse gab:

5,355 mg	16,385 mg CO_2	5,40 mg H_2O
4,805 ,,	14,650 ,, ,,	4,86 ,, ,,
	83,46% C	11,28% H
	83,37% ,,	11,32% ,,

Dieser **Mittellauf** ist ein dickflüssiges, lichtgelbes Öl. Es wird in einer Kältemischung fest; gibt keine Kristallausscheidung, selbst bei monatelangem Aufbewahren im Vakuum; bräunt sich an der Luft,

gibt intensiv die *Salkowski-* und die *Liebermann-Burchard*sche Reaktion, doch keine *Pettenkofer-* und *Mylius*sche Reaktion.

Die optische Aktivität des Mittellaufes wurde mit dem großen *Landolt-Lippich*schen Apparat im Mikropolarisationsrohr untersucht: die Substanz selbst ließ das polarisierte Licht nicht durch, und in 10proz. methylalkoholischer Lösung erwies sie sich als *inaktiv*.

Das Molekulargewicht wurde nach der Mikromethode von *K. Rast*[1]) bestimmt. Die Substanz löste sich sehr gut in Kampfer auf.

6,97 mg Substanz in 56,78 mg Kampfer gelöst: 11° Schmelzpunkterniedrigung.

Gefunden:	Berechnet für $C_{32}H_{52}O_2$:
446	468

Obschon es sehr schwierig ist, bei so hoch molekularen und schwer verbrennbaren Substanzen eine einwandfreie Formel aufzustellen, so kann doch auf Grund der Analyse mehrerer Derivate und der Molekulargewichtsbestimmung die angenommene Formel $C_{32}H_{52}O_2$ als sehr wahrscheinlich angesehen werden.

Tetrabromderivat. Brom gegenüber zeigte sich die Verbindung ungesättigt. Sie nahm vier Atome Brom auf und lieferte ein Bromadditionsprodukt von der Formel $C_{32}H_{52}O_2Br_4$. Eine Lösung der Substanz in Eisessig wurde so lange mit einer Bromlösung in Eisessig langsam versetzt, bis sich die Bromlösung nicht mehr entfärbte, und mit einem geringen Überschuß an Brom 24 Stunden in der Kälte im Dunkeln stehengelassen. Da sich nichts ausschied, wurde das Reaktionsprodukt mit Wasser versetzt. Es bildete sich eine Emulsion, die sich nach einigem Stehen ölig absetzte. Das Öl wurde mit Äther aufgenommen, mit Wasser geschüttelt, die ätherische Lösung getrocknet; nach dem Verdunsten des Äthers im Vakuumexsikkator über Paraffin und Ätzkali, kristallisierte der dicke dunkelrotbraune Sirup nicht.

5,34 mg geben . . .	9,59 mg CO_2	3,22 mg H_2O
5,17 „ „ . . .	9,235 „ „	3,17 „ „
10,56 „ „ . . .	10,050 „ AgBr	
6,48 „ „ . . .	6,145 „ „	

	Gefunden:		Berechnet für $C_{32}H_{52}O_2Br_4$:
C . . .	48,98 %	48,73 %	48,73 %
H . . .	6,75 %	6,86 %	6,65 %
Br . . .	40,50 %	40,36 %	40,56 %

Molekulargewichtsbestimmung:

4,260 mg Substanz in 11,70 mg Kampfer gelöst: 19° Schmelzpunkterniedrigung.

Gefunden:	Berechnet für $C_{32}H_{52}O_2Br_4$:
766	788

[1]) Ber. 55, 1051, 1922.

Über die Natur der beiden Sauerstoffatome wurde festgestellt, daß das eine in einer Carbonylgruppe vorhanden ist, da mit Phenylhydrazin das Hydrazon $C_{38}H_{58}ON_2$ entsteht; das andere Sauerstoffatom ist in einer Hydroxylgruppe vorhanden, da die Verbindung durch Acylierung mit Benzoesäureanhydrid, Essigsäureanhydrid und Benzoesulfochlorid Ester bildet.

Phenylhydrazon. Eine Lösung der Substanz in Eisessig wurde mit einem kleinen Überschuß an mehrfach aus Äther umkristallisiertem Phenylhydrazin versetzt. Nach einigem Stehen in der Kälte schied sich das Kondensationsprodukt ölig ab. Es wurde aus Wasser und Alkohol gereinigt. Der dunkelorangerote Sirup kristallisierte nicht.

4,96 mg geben . . . 14,84 mg CO_2 4,685 mg H_2O
3,585 „ „ . . . 0,167 ccm N bei 741 mm Hg 21° *t*
4,675 „ „ . . . 0,213 „ „ „ 741 „ „ 20° *t*

	Gefunden:	Berechnet für $C_{38}H_{58}ON_2$:
C . . .	81,62 %	81,66 %
H . . .	10,57 %	10,46 %
N . . .	5,27 bis 5,17 %	5,01 %

Acetylverbindung des Phenylhydrazons. Das Phenylydrazon wurde mit Essigsäureanhydrid am Wasserbad nur kurze Zeit erwärmt. Der Überschuß des Anhydrids wurde mit absolutem Alkohol verjagt. Der rotbraune Sirup kristallisierte aus Alkohol und Essigäther nicht.

2,385 mg geben . . 6,98 mg CO_2 2,225 mg H_2O
2,425 „ „ . . 7,09 „ „ 2,220 „ „
2,858 „ „ . . 0,116 „ N bei 745 mm Hg 22° *t*

	Gefunden:		Berechnet für $C_{40}C_{60}N_2O_2$:
C . . .	79,84 %	79,76 %	79,94 %
H . . .	10,44 %	10,27 %	10,068 %
N . . .	4,604 %		4,664 %

Oxim. Zur Darstellung des Oxims wurde die Substanz in alkoholischer Lösung mit der berechneten Menge einer alkoholischen Lösung von freiem Hydroxylamin 2 Stunden am Wasserbad erwärmt. Nach mehrtägigem Stehen schied sich das Oxim als eine halbfeste Substanz erst auf Zusatz von Aceton aus. Wiederholt aus Aceton und Alkohol gereinigt, kristallisierte die Verbindung nicht.

5,27 mg geben . . 15,32 mg CO_2 5,22 mg H_2O
6,01 „ „ . . 0,152 ccm N bei 749 mm Hg 15° *t*
7,715 „ „ . . 0,182 „ „ „ 748 „ „ 16° *t*

	Gefunden:		Berechnet für $C_{32}H_{53}O_2N$:
C . . .	79,31 %		79,44 %
H . . .	11,09 %		11,05 %
N . . .	2,95 %	2,76 %	2,89 %

Benzolsulfoester des Tetrabromkörpers. Das Tetrabromid wurde in Pyridinlösung mit Benzolsulfochlorid versetzt. Beim Versetzen mit

verdünnter Schwefelsäure schied sich das Produkt ölig ab. Das Öl wurde mit Äther aufgenommen, mit Wasser gewaschen. Es kristallisiert aus keinem Lösungsmittel.

3,705 mg geben . .	6,690 mg CO_2	2,045 mg H_2O
3,405 „ „ . .	8,105 „ $BaSO_4$	

Gefunden:	Berechnet für $C_{38}H_{56}O_4Br_4S$:
C . . . . 49,26 %	49,14 %
H . . . . 6,17 %	6,08 %
S . . . . 3,27 %	3,45 %

Benzoesäureester. Die Substanz wurde mit Benzoesäureanhydrid im Paraffinbad 2 Stunden auf 150⁰ erwärmt. Die Reaktionsmasse mit Methylalkohol versetzt, ging nur zum Teil in Lösung. Aus dieser Lösung wurden Benzoesäurekristalle ausgeschieden. Der unlösliche Rest wurde mehrmals mit Methylalkohol gereinigt, bis keine Benzoesäure mehr aufgenommen wurde. Der dunkelbraune Sirup kristallisiert nicht.

5,73 mg geben . .	17,15 mg CO_2	5,145 mg H_2O
4,385 „ „ . .	13,12 „ „	3,88 „ „

	Gefunden:		Berechnet für $C_{39}H_{56}O_3$:
C . . .	81,65 %	81,62 %	81,76 %
H . . .	10,05 %	9,90 %	9,85 %

Bariumverbindung. Die reine Substanz wurde in methylalkoholischer Lösung mit methylalkoholischer Barytlösung gefällt. Die ausgefällte Verbindung wurde mit Methylalkohol gewaschen. Die halbfeste gelbe Verbindung kristallisierte nicht.

4,375 mg geben . .	11,195 mg $BaSO_4$
3,46 „ „ . .	8,155 „ „

Gefunden:	Berechnet für $(C_{32}H_{51}O_{22})Ba$:
Ba. . . . 14,92 %	12,83 %
13,87 %	

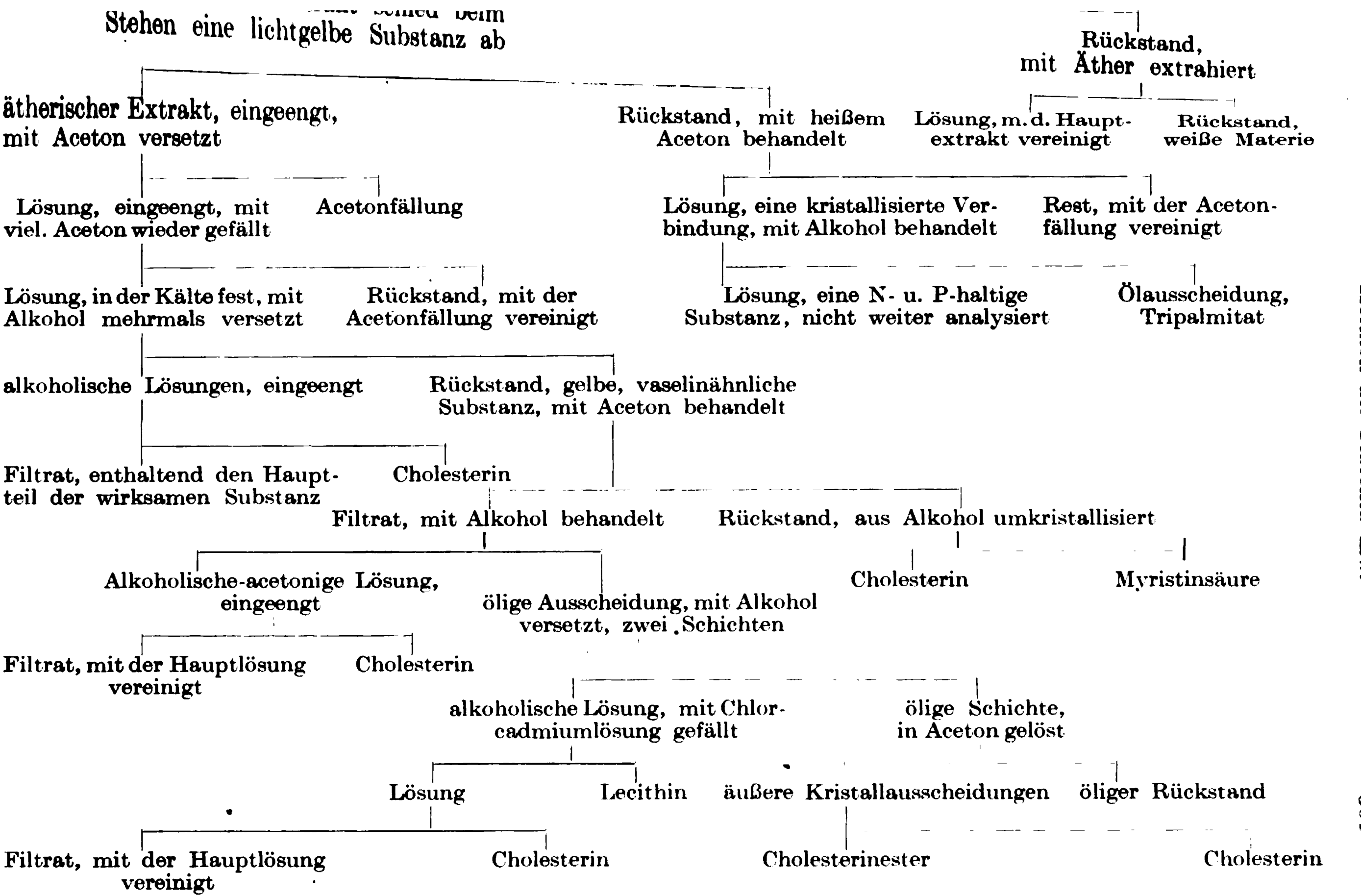
Zusammenfassung.

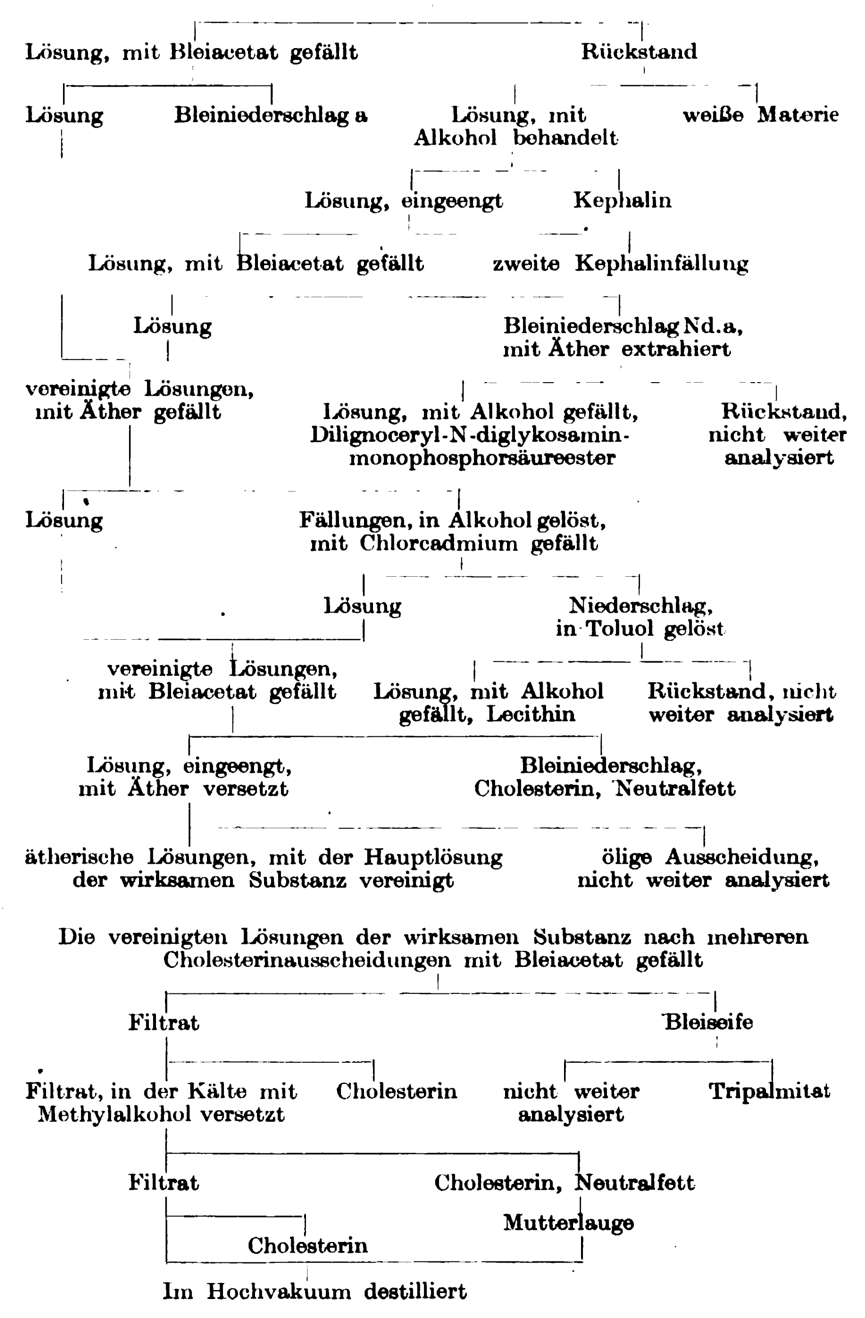
Es ist uns gelungen, sowohl aus der Placenta als auch aus dem Corpus luteum in gleicher Weise und mit gleicher Methodik die zuerst von *E. Herrmann* im hiesigen Laboratorium in der Placenta gefundene Substanz darzustellen und zu zeigen, daß diese hochwirksame Substanz aus beiden Geweben ganz identisch ist. Die Verbindung ist ein dickflüssiger, ganz lichtgelber harziger Körper von Terpentingeruch, vom Siedepunkt 194⁰ bei 0,064 mm Hg, unlöslich in Wasser, löslich in allen organischen Lösungsmitteln. Diese Substanz konnten wir rein darstellen, ihre Elementaranalyse und Molekulargewichtsbestimmung, sowie die Elementaranalyse einer Anzahl von Derivaten dieses für sich nicht kristallisierenden Körpers durchführen und seine Bruttoformel feststellen. Diese Bruttoformel ist $C_{32}H_{52}O_2$. Bei dieser Formel

hatte man die Wahl zwischen C_{16} und einem O-Atom, oder C_{32} und zwei O-Atomen. Da die Rolle der beiden O-Atome durch Versuche aufgeklärt wurde, bleibt nur die Möglichkeit der Annahme von C_{32} und zwei O-Atomen übrig, welche besonders durch den Benzolsulfoester erwiesen erscheint, ebenso durch das Oxim. Die beiden Sauerstoffe gehören zwei Gruppierungen an: der eine Sauerstoff ist in einer Hydroxylgruppe, die durch die Ester erwiesen ist, der zweite in einer Carbonylgruppe. Die Substanz addiert vier Bromatome, so daß man annehmen muß, daß es sich um zwei Doppelbindungen handelt. Die Substanz zeigt die Cholesterinreaktion, so daß man auf Verwandtschaft mit Cholesterin und Gallensäuren schließen könnte, da letztere Verbindungen nahe verwandt sind. Nun hat Cholesterin $C_{27}H_{46}OH$ 27 C-Atome, die Cholalsäure nur 24 C-Atome. Diese Substanz könnte auch in Beziehung stehen zu dem Bufotalin, welches von *Wieland* und *Weil*[1]), *H. Wieland* und *P. Weyland*[2]) und *Wieland* und *R. Alles*[3]) untersucht wurde. Dieses Bufotalin, ein Abspaltungsprodukt des Bufotaxins $C_{40}H_{62}O_{11}N_4$, hat die Zusammensetzung $C_{26}H_{36}O_6$. Zwei C-Atome gehören einer in Esterform gebundenen Acetylgruppe an, zwei O-Atome sind in Laktonform vorhanden und zwei als Hydroxyle. Das Bufotalin nimmt vier H-Atome auf und enthält zwei C-Doppelverbindungen. Wenn unsere Verbindung mit diesen drei bekannten: Cholesterin, Cholalsäure und Bufotalin, in einem Zusammenhang steht, so ist es auffällig, daß wir hier eine weitere Kohlenstoffkette haben, die dem Cholesterin fünf, der Cholalsäure gegenüber acht C-Atome mehr enthält und nicht durch Sauerstoff, sondern durch Kohlenstoffbindung zusammenhängt. Während Cholesterin zwei Bromatome aufnimmt, nimmt unsere Verbindung vier Bromatome auf.

Wir haben im Laufe der Analyse des Chloroformextraktes des Corpus luteum außer der wirksamen Substanz das Vorhandensein von weißer Materie und eines Galaktosides, das nicht weiter analysiert wurde, nachweisen können; außerdem wurde eine Anzahl ungesättigter Phosphatide gefunden, von denen nur Kephalin, Lecithin, und in geringer Menge Dilignoceryl-N-diglykosaminmonophosphorsäureester bestimmt wurden; ferner Cholesterin, Cholesterinester und in großer Menge Neutralfette, die bis auf Glycerintripalmitat und freie Myristinsäure, der eine besondere Aufmerksamkeit gebührt, nicht weiter untersucht wurden.

[1]) Berl. Ber. 46, 3315, 1913.
[2]) Sitzungsber. d. Bayr. Akad. d. Wiss. 1920, S. 329.
[3]) Berl. Ber. 1922, S. 1789.


Stehen eine lichtgelbe Substanz ab
ätherischer Extrakt, eingeengt, mit Aceton versetzt
Rückstand, mit heißem Aceton behandelt
Rückstand, mit Äther extrahiert
Lösung, m. d. Hauptextrakt vereinigt
Rückstand, weiße Materie
Lösung, eingeengt, mit viel. Aceton wieder gefällt
Acetonfällung
Lösung, eine kristallisierte Verbindung, mit Alkohol behandelt
Rest, mit der Acetonfällung vereinigt
Lösung, in der Kälte fest, mit Alkohol mehrmals versetzt
Rückstand, mit der Acetonfällung vereinigt
Lösung, eine N- u. P-haltige Substanz, nicht weiter analysiert
Ölausscheidung, Tripalmitat
alkoholische Lösungen, eingeengt
Rückstand, gelbe, vaselinähnliche Substanz, mit Aceton behandelt
Filtrat, enthaltend den Hauptteil der wirksamen Substanz
Cholesterin
Filtrat, mit Alkohol behandelt
Rückstand, aus Alkohol umkristallisiert
Alkoholische-acetonige Lösung, eingeengt
ölige Ausscheidung, mit Alkohol versetzt, zwei Schichten
Cholesterin
Myristinsäure
Filtrat, mit der Hauptlösung vereinigt
Cholesterin
alkoholische Lösung, mit Chlorcadmiumlösung gefällt
ölige Schichte, in Aceton gelöst
Lösung
Lecithin
äußere Kristallausscheidungen
öliger Rückstand
Filtrat, mit der Hauptlösung vereinigt
Cholesterin
Cholesterinester
Cholesterin


Acetonfällung
mit Alkohol behandelt
Lösung, mit Bleiacetat gefällt
Rückstand
Lösung
Bleiniederschlag a
Lösung, mit Alkohol behandelt
weiße Materie
Lösung, eingeengt
Kephalin
Lösung, mit Bleiacetat gefällt
zweite Kephalinfällung
Lösung
Bleiniederschlag Nd.a, mit Äther extrahiert
vereinigte Lösungen, mit Äther gefällt
Lösung, mit Alkohol gefällt, Dilignoceryl-N-diglykosamin-monophosphorsäureester
Rückstand, nicht weiter analysiert
Lösung
Fällungen, in Alkohol gelöst, mit Chlorcadmium gefällt
Lösung
Niederschlag, in Toluol gelöst
vereinigte Lösungen, mit Bleiacetat gefällt
Lösung, mit Alkohol gefällt, Lecithin
Rückstand, nicht weiter analysiert
Lösung, eingeengt, mit Äther versetzt
Bleiniederschlag, Cholesterin, Neutralfett
ätherische Lösungen, mit der Hauptlösung der wirksamen Substanz vereinigt
ölige Ausscheidung, nicht weiter analysiert
Die vereinigten Lösungen der wirksamen Substanz nach mehreren Cholesterinausscheidungen mit Bleiacetat gefällt
Filtrat
Bleiseife
Filtrat, in der Kälte mit Methylalkohol versetzt
Cholesterin
nicht weiter analysiert
Tripalmitat
Filtrat
Cholesterin, Neutralfett
Mutterlauge
Cholesterin
Im Hochvakuum destilliert

Es war bei unseren Untersuchungen auffällig, daß der durch Hochvakuumdestillation gewonnene wirksame Körper gegenüber dem zu destillierenden Sirup eine jedenfalls verminderte Wirksamkeit zeigte. Ebenso auffällig war es, daß dieser Körper keine Drehung zeigt. Es war daher die Möglichkeit nicht ausgeschlossen, daß der destillierte wirksame Körper bei der Destillation im Hochvakuum bei einer so hohen Temperatur eine Veränderung erfahren hat. Aus diesem Grunde haben wir neuere Versuche eingeleitet, mit Umgehung der Hochvakuumdestillation nach einem besonderen Verfahren die wirksame Substanz zu gewinnen. Wir werden über die nach dem neuen Verfahren dargestellte Verbindung in nächster Zeit weiteres veröffentlichen.

Einige elektrometrische Eichungen mit Berücksichtigung der Ionenaktivität.

Von

Leonor Michaelis und **Kosaku Kakinuma.**

(Aus dem biochemischen Institut der Vereinigten Fabriken für Laboratoriumsbedarf in Berlin.)

(Eingegangen am 12. Februar 1923.)

Mit 6 Abbildungen im Text.

1. Problemstellung.

In der Auffassung von der elektrolytischen Dissoziation der Elektrolyte vollzieht sich zurzeit eine Wandlung, deren praktische Tragweite noch nicht genau überblickt werden kann. Jedenfalls darf man als gesichert annehmen, daß die älteren Anschauungen über die Dissoziation der *starken* Elektrolyte einer Revision bedürfen, und wir kommen zurzeit der Wahrheit wohl am nächsten, wenn wir diese starken Elektrolyte mit *N. Bjerrum* und *Ch. J. Ghoch*[1]) stets als total dissoziiert annehmen und wenn wir uns davor hüten, aus den Leitfähigkeitsdaten unmittelbar Schlüsse auf den Dissoziationszustand zu ziehen. Dafür müssen wir aber mit *Bjerrum* den neuen Begriff der *Ionenaktivität* einführen, welche dem Umstand Rechnung trägt, daß die elektromotorische oder chemische Wirksamkeit einer Ionenart ihrer wahren Konzentration nicht streng proportional ist, sondern außer von ihrer Konzentration auch von der Konzentration und der Art der *anderen* gleichzeitig gelösten Ionenarten abhängig ist[1]). Die Sache liegt heute geradezu derart, daß man im allgemeinen von irgend einer in Lösung befindlichen Ionenart nur ihre Aktivität, nicht aber ihre wahre Konzentration bestimmen kann. Der Koeffizient, mit welchem man die wahre Konzentration einer Ionenart multiplizieren muß, um ihre Aktivität zu erhalten, ist der *Bjerrum*sche Aktivitätskoeffizient f_a. Er ist also im Grunde nur ein Korrekturfaktor, welcher so gewählt ist, daß man die Aktivitäten an Stelle der Konzentrationen

---

[1]) *N. Bjerrum*, Zeitschr. f. Elektr. **24**, 321, 1918; Medd. från Nobel-Inst. **5**, 1919; *Ghoch* referiert in *Nernst*, Theoret. Chem. 10. Aufl., 1922: den Physiologen sei zur Einführung besonders empfohlen: *E. J. Warburg*, Biochem. Journ. **16**, 162, 1922; s. auch *L. Michaelis*, Die Wasserstoffionenkonzentration, 2. Aufl. Berlin 1922.

in die Formel des Massenwirkungsgesetzes oder in die *Nernst*sche Formel der Elektrodenpotentiale einsetzen muß, um mit der Erfahrung in Übereinstimmung zu bleiben. Denn wenn man die Konzentrationen selbst in diese Formeln einsetzt, so erhält man offensichtlich Widersprüche mit der experimentellen Erfahrung.

Diese Darstellung des Aktivitätsfaktors als einer bloßen, nur von Fall zu Fall empirisch zu eichenden Größe kann nicht die endgültige sein. Sie ist auch von den Begründern dieser Theorie nicht so gedacht. Überblicken wir aber den heutigen Stand dieser Theorie, so vermissen wir heute noch einen sicheren Abschluß. Da wir Biochemiker aber notwendigerweise unser Zahlenmaterial auf Grund dieser neuen Anschauungen revidieren müssen, ist es angebracht, die erforderlichen Daten rein empirisch zu eichen. Der Sinn der vorliegenden Arbeit ist also folgender: Die Ionenaktivitätstheorie wird rein qualitativ als gültig angenommen, dagegen wird jede spezielle oder quantitative, nur durch theoretische Berechnung gewonnene Zahl prinzipiell vermieden, wie z. B. die *Bjerrum*sche Formel zur *Berechnung* der Aktivitätskoeffizienten. Vielmehr werden *absichtlich*, *ohne jede Rücksicht auf die theoretische Literatur*, alle Zahlen rein experimentell ermittelt, und es wird nichts weiter als folgende theoretische Annahmen zugrunde gelegt:

1. Wir betrachten die starken Elektrolyte stets als vollständig dissoziiert.

2. Wir nehmen an, daß die aktive Masse einer Ionenart, wie sie bei der chemischen Massenwirkung und bei der elektromotorischen Wirksamkeit an einer Elektrode zur Geltung kommt, nicht streng der Konzentration dieser Ionenart proportional zu sein braucht.

3. Wenn die Gesamtkonzentration aller Ionen einer wässerigen Lösung sich der Null nähert, so wird näherungsweise der Fall verwirklicht, daß die aktive Masse einer jeden Ionenart ihrer Konzentration proportional ist.

Und von den neuen Begriffen verwenden wir einzig den des *Aktivitätsfaktors* und *der Aktivität*, und wir definieren:

1. Für *unendlich verdünnte* Lösungen setzen wir die Aktivität einer Ionenart gleich ihrer Konzentration.

2. Für *beliebig konzentrierte* Lösungen einer Ionenart verstehen wir unter *Aktivität* dieser Ionenart diejenige Größe, welche wir an Stelle der bisher verwendeten Größe, nämlich der Konzentration, in die *Nernst*sche Formel für das Elektrodenpotential einsetzen müssen.

3. Diejenige Zahl, mit welcher man die Konzentration zu multiplizieren hat, um die Aktivität zu erhalten, nennen wir nach *Bjerrum* den *Aktivitätsfaktor*.

2. Methodische Vorbemerkungen.

Unsere Messungen beziehen sich sämtlich auf das Potential von Platin-Wasserstoffelektroden, bezogen auf das Potential einer willkürlichen, aber gut reproduzierbaren Ableitungselektrode. Unsere Methode ist im allgemeinen die schon früher beschriebene; jedoch sollen einige neuere Erfahrungen in der Methodik besonders beschrieben werden. Als Elektrode benutzten wir die *Birnelektrode* mit *Drehstativ*, genau wie sie in der zweiten Auflage des „Praktikum der physikalischen Chemie"[1]) beschrieben ist; als Ableitungselektrode wurde eine gesättigte Kalomelelektrode benutzt, aber nicht derart, daß deren Potential als eine konstante, sicher reproduzierbare Größe betrachtet wurde. Ihr Potential wurde vielmehr täglich an der „Standardacetat"-Elektrode geeicht, erstens weil diese uns besser und müheloser reproduzierbar erschien als irgend eine Kalomelelektrode, zweitens weil dadurch Barometer- und Dampfdruckkorrekturen überflüssig gemacht werden. Über das Diffusionspotential sei noch etwas Besonderes mitgeteilt. Da wir oft ziemlich stark saure und alkalische Lösung zu messen haben, so genügt die Zwischenschaltung einer gesättigten KCl-Lösung nicht, um immer mit Sicherheit das Diffusionspotential zu vernichten. Die bisher gebräuchlichste Methode für solche Fälle ist die zweizeitige Messung nach *Bjerrum*: erstens Messung mit Zwischenschaltung einer 1,75 n KCl-Lösung, zweitens Messung mit 3,5 n KCl-Lösung; sodann den Unterschied beider Resultate noch einmal als Extrapolation hinzufügen. Wir verwendeten hier eine andere Methode, die sich, wie wir glauben, hier gut bewährt hat und zur Nachprüfung empfohlen werden mag: Das Ende des Ausflußrohres unserer „Birnelektrode" ist ein wenig nach oben gerichtet. Es wird durch einen mit einer KCl-gesättigten Agargallerte gefüllten Glasheber mit einer Wanne mit gesättigter KCl-Lösung verbunden. Wenn man nun das nach oben gerichtete Ausflußende der Birnelektrode außerdem noch mit einem Überschuß fein gepulverter KCl-Kristalle füllt, bevor man das Agarrohr hineinsteckt, so haben wir folgende Flüssigkeitsverbindungen:

1. die zu messende Lösung, also z. B. n/100 HCl;
2. die gleiche Lösung, aber noch dazu gesättigt mit KCl;
3. gesättigte KCl-Lösung ohne HCl (im Agarrohr und weiterhin in der KCl-Wanne).

Die Lösungen 1. und 2. enthalten die gleiche Konzentration HCl, würden also *ohne* KCl kein Diffusionspotential gegeneinander haben. Durch den Zusatz von KCl (in 2.) kann aber gewiß kein praktisch merkliches Potential *erzeugt* werden. Ferner, was die Grenze 2. 3. betrifft, so hat schon eine verdünnte HCl-Lösung *ohne* KCl gegen

[1]) *L. Michaelis* (2. Aufl.). Berlin, Jul. Springer, 1922.

eine gesättigte KCl-Lösung ein sehr geringes Potential. Noch viel kleiner muß dasselbe also werden, wenn diese HCl-Lösung noch dazu mit KCl gesättigt ist. Abgesehen hiervon, hat der Zusatz der KCl-Kristalle noch den Vorteil, daß die mit KCl gesättigte Agarspitze im Laufe der Zeit durch Diffusion nicht an KCl verarmt. Diese Überlegungen, dazu die praktische Erfahrung, scheint für die Nützlichkeit dieser Anordnung beweisender, als wenn man die Diffusionspotentiale an den Grenzflächen, sei es nach *Planck* oder nach *P. Henderson*, berechnet, denn diese Rechnungen werden für gesättigte Lösungen doch illusorisch. Diese Methode der Ausschaltung des Diffusionspotentials wird in einer besonderen Arbeit noch genauer begründet werden.

Zum mindestens von n/100 HCl an gibt die *Bjerrum*sche Extrapolation praktisch denselben Wert wie unsere Methode, und bei noch dünneren Lösungen erfordert die *Bjerrum*sche Extrapolation einerseits keine Extrapolationskorrektur mehr und stimmt gleichzeitig mit unserer Methode überein. Wir können somit annehmen, daß unsere Methode mindestens den gleichen, wahrscheinlich sogar noch einen größeren Effekt auf die Ausschaltung des Diffusionspotentials hat als die Methode von *Bjerrum*, d. h. daß zum mindesten in denjenigen Fällen, in denen die zweizeitige Messung nach *Bjerrum* und die Extrapolation erlaubt ist, unsere einzeitige Messung ohne jede Extrapolation ebenso brauchbar ist. Es wird in der in Aussicht gestellten weiteren Mitteilung genauer zu untersuchen sein, bis zu welchen Grenzen unsere Methode erlaubt ist; im folgenden wird sie nur für solche Lösungen angewendet, bei denen die Extrapolation nach *Bjerrum* sehr klein ist; und in diesen Fällen ist unsere Methode gewiß immer unbedenklich.

3. Potentialunterschiede von HCl-Lösungen verschiedener Konzentration nebst Eichung des Standardacetats.

Zunächst wurden mit dieser Methodik die Potentialunterschiede reiner HCl-Lösungen verschiedener Konzentration gegen eine willkürliche Ableitungselektrode gemessen, und zwar gegen die Standardacetatelektrode (unter Zuhilfenahme der gesättigten Kalomelelektrode, welche, wie beschrieben, nur als technisches Hilfsmittel, nicht als selbständige Standardelektrode benutzt wurde). Wir erhielten die in Tabelle I wiedergegebenen Werte, welche in Abb. 1 im Diagramm wiedergegeben sind.

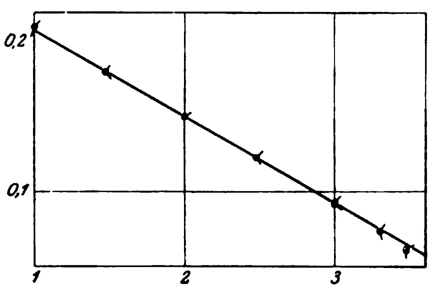


Abb. 1. Abszisse: Logarithmus der reziproken HCl-Konzentration. Ordinate: Potentialunterschied gegen die Standardacetat-Elektrode.

Tabelle 1.

Konzentration der Salzsäure in Normalität	Potentialunterschied gegen die Wasserstoffelektrode mit Standardacetat (Millivolt) — Erste Versuchsreihe (18,0 °C)	Zweite Versuchsreihe (18,5 °C)	Berechnet unter der Annahme des Aktivitätsfaktors 1,00	Abweichung der berechneten Werte vom Mittel der Beobachtungen in Millivolt
n/10 HCl	209,5	209,2	(207,7)	(— 1,65)
n/30 HCl	180,1	181,0	180,2	— 0,35
n/100 HCl	150,3	150,5	150,0	— 0,40
n/300 HCl	122,3	122,5	122,5	+ 0,10
n/1000 HCl	92,3	91,5	92,3	+ 0,40
n/2000 HCl	73,3	73,2	(74,9)	(+ 1,65!)
n/3000 HCl	61,1	60,8	(64,8)	(+ 3,85!)

Betrachten wir nun die erhaltenen Resultate, so zeigt sich folgendes:

Stellen wir das p_H auf der Abszisse, das Potential auf der Ordinate dar, so liegen alle Beobachtungspunkte innerhalb der zuzubilligenden Fehlergrenze von wenigen Zehnteln Millivolt auf einer geraden Linie, deren Neigungstangente = 57,7 ist. Größere Abweichungen finden sich erstens bei der höchsten Konzentration, bei n/10 Salzsäure (bei dem Abszissenpunkt 1,0) und zweitens bei den allerstärksten Verdünnungen, abwärts von n/1000, in auffälliger Weise erst von n/3000 Lösungen an, wo die Abweichung vom erwarteten Wert etwa 4 Millivolt beträgt. Diese beiden letzten Punkte können wir für die theoretische Betrachtung ausschließen, weil Lösungen von so starker Verdünnung der Messung große Schwierigkeiten bieten. Erstens ist die Ablesung am Kapillarelektrometer bei einer so schlecht leitenden Flüssigkeit nicht mehr so exakt, zweitens spielen in diesen Verdünnungen Verunreinigungen schon eine bedeutende Rolle. Das zeigt sich auch darin, daß die erhaltenen Werte von den berechneten nicht nur abweichen, sondern bei weitem nicht den hohen Grad von Konstanz und Reproduzierbarkeit zeigen wie die anderen. Sehen wir von diesen unsicheren Punkten ab, so bemerken wir, daß der Potentialunterschied zwischen den einzelnen Verdünnungen genau derjenige ist, wie er sein müßte, wenn die Aktivität der H-Ionen genau gleich der Konzentration der Säure ist. Wir müssen also annehmen, daß innerhalb des Konzentrationsbereiches von n/30 bis mindestens n/1000 der Aktivitätskoeffizient der H-Ionen *innerhalb der Fehlergrenzen der Messung* der gleiche ist, und es bleibt auf diese Weise nichts anderes übrig, als ihn gleich 1,0 anzunehmen. Erst bei einer Konzentration von n/10 scheint er deutlich kleiner als 1 zu werden.

Im übrigen kann man noch auf andere Weise beweisen, daß die für die allerniedrigsten Konzentrationen erhaltenen Werte fehlerhaft sind. Da der Aktivitätskoeffizient mit fallender Konzentration niemals größer als 1 werden kann, so ist es nicht möglich, daß die in der Abb. 1 dargestellte gerade Linie unter einem steileren Winkel als dem gezeichneten

(tg $\varphi = 57{,}7$) verläuft. Da nun aber die beobachteten Punkte für jene höchste Verdünnung scheinbar einen steileren Verlauf zeigen, so erweist sich hierin ganz offenkundig, daß diese Beobachtungen fehlerhaft sind.

Wir nehmen somit an, *daß in HCl-Lösungen, deren Konzentration kleiner als m/30 ist, der Aktivitätskoeffizient der H-Ionen praktisch stets gleich 1 ist.* Wir sind uns der theoretischen Unvollkommenheit dieser Annahme bewußt und wollen damit nur, unserer Vornahme gemäß, zum Ausdruck bringen, daß wir auf Grund elektrometrischer Messungen bei dem heutigen Stande der Fehlerbreite der Methode (einige Zehntel Millivolt) keinen Grund haben, jene einfachste Annahme als praktisch ungenügend zu bezeichnen. Wir werden trotzdem die Vorsicht gebrauchen, die soeben ausgesprochene Annahme im folgenden nur für Konzentrationen von m/100 HCl abwärts wirklich zu benutzen.

Folgender Einwand wäre gegen diese Auffassung möglich. Da das benutzte destillierte Wasser niemals ganz rein sein kann, so könnte man meinen, daß ein Gehalt etwa an NH_3 dieses Resultat hervortäuschen könne. Dieses Alkali würde um so belangreicher sein, je verdünnter die HCl-Lösung ist, und so könnte der Gehalt an Alkali das Resultat hervortäuschen, daß der Aktivitätskoeffizient der H-Ionen innerhalb der von uns gefundenen Grenzen praktisch konstant bliebe. In der Tat bemerken wir ja bei noch weiterer Verdünnung den Einfluß der Verunreinigungen deutlich. Daß aber schon bei Konzentrationen von n/100 bis n/1000 HCl diese Verunreinigungen eine merkliche Rolle spielen, kann durch folgende Erfahrung unwahrscheinlich gemacht werden: wenn man verschiedene HCl-Verdünnungen von n/200 bis n/1000 in n/10 KCl-Lösungen herstellt, so bleibt der Aktivitätskoeffizient der H-Ionen ganz bestimmt praktisch immer der gleiche, und wenn das Wasser rein genug ist, muß der Potentialunterschied dieser verschiedenen HCl-Lösungen *genau* nach der *Nernst*schen Formel berechenbar sein, wenn man einfach mit den *Konzentrationen* statt mit den Aktivitäten rechnet. Eine lange Erfahrung zeigte nun, daß dies in der Tat zutrifft, und zwar bis zu denselben Verdünnungen herunter, wie es jetzt für salzfreie HCl-Lösungen gezeigt wurde; erst weit *unterhalb* n/1000, manchmal sogar erst unterhalb n/10000 begannen die Verunreinigungen sich durch die sonst unerklärlichen Abweichungen der Potentiale von den erwarteten Werten bemerkbar zu machen.

In so verdünnten HCl-Lösungen ist also ganz einfach die Aktivität der H-Ionen gleich der Konzentration der HCl. Wir können dies auch so ausdrücken: Der Begriff des Aktivitätsfaktors hat, wie oben erwähnt, nur Sinn, wenn wir annehmen dürfen, daß mit fallender Konzentration dieser Faktor sich der 1 nähert. Unsere Versuche besagen also, daß im vorliegenden Falle, also für HCl, die Konzentration von n/100 schon als unendlich klein in diesem Sinne betrachtet werden darf.

Wir wollen nunmehr die Gelegenheit benutzen, um auf Grund dieser Voraussetzung das p_H des Standardacetats zu eichen, indem wir seine P. D. gegen n/500 HCl bestimmen, und in letzterer $p_H = 2{,}699$ setzen. Es ergab sich folgendes:

Tabelle II.

Temperatur °C	P. D. einer n/500 HCl-Lösung gegen Standardacetat (Millivolt)	p_H des Standardacetats (berechnet)
17,5	110,0	4,609
18,0	110,0	4,604
18,5	110,0	4,602
18,5	110,5	4,611
19,0	110,5	4,607
19,0	110,0	4,599
19,0	111,2	4,618
20,5	111,0	4,606
22,5	111,7	4,605
Mittel: 19,1	—	Mittel: 4,607

(Auf Grund etwas anderer Voraussetzungen hatten *Michaelis* und *Krüger*[1]) gefunden: 4,616.)

4. Der Einfluß der Neutralsalze auf die Aktivität der H-Ionen.

a) HCl-Lösungen.

n/500-Lösungen von HCl wurden bei Gegenwart von Neutralsalzen verschiedener Art und Konzentration mit der Gaskette gemessen und die in folgender Tabelle III (Abb. 2) dargestellten Werte erhalten. Es sei gleich bemerkt, daß der besonders große Einfluß des NaCl nicht auf einer Unreinheit des Präparates beruhen kann. Denn ein aus dem benutzten Präparat (*Kahlbaum*) nochmals umkristallisiertes Präparat ergab mit den ersten Messungen absolut identische Werte.

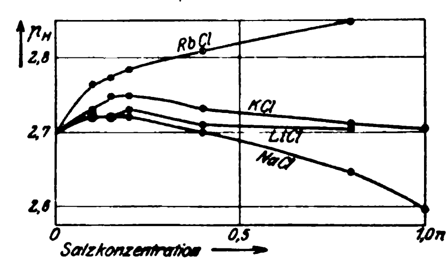


Abb. 2. Abszisse: Konzentration des Salzes, welches einer n/500 HCl-Lösung zugefügt wird. Ordinate: p_H.

Wir bemerken eine deutliche Ionenreihe; die spezifische Natur der Ionen kommt in sehr auffälliger Weise zum Ausdruck. Wir haben das auffällige Resultat, daß die Aktivität der H-Ionen durch Zusatz von NaCl in höheren Konzentrationen > 1 wird. Wir können dieses Verhalten am einfachsten durch folgende Darstellung begreiflich machen: eine starke NaCl-Lösung verhält sich wie ein Lösungsmittel von größerer Dielektrizitätskonstante als Wasser, und daher wie ein Medium, gegen welches Wasserstoff einen anderen „elektrolytischen Lösungsdruck" als gegen salzfreies Wasser hat. Eine „Konzentrationskette" zwischen einer salzarmen wässerigen Lösung und einer NaCl-haltigen wässerigen

[1]) Diese Zeitschr. **119**, 307, 1921.

Tabelle III. p_H der n/500 HCl beim Zusatz verschiedener Salze in verschiedenen Konzentrationen (auf das p_H der n/500 HCl = 2,699 bezogen).

Arten der Salze	Temperatur °C	Konzentration der zugesetzten Salze 0,1 n	0,15 n	0,2 n	0,4 n	0,8 n	1,0 n
NaCl	19,0	2,717	2,721	2,721	2,702	2,651	—
NaCl	19,0	2,725	2,721	2,717	2,699	2,647	—
NaCl	19,0	2,721	—	2,739	2,699	2,651	—
NaCl	19,0	2,721	2,720	2,721	2,699	2,639	2,595
Mittel	—	**2,721**	**2,721**	**2,722**	**2,700**	**2,647**	**2,595**
KCl	19,0	2,720	2,742	2,742	2,730	2,708	—
KCl	19,0	2,742	2,751	2,751	2,734	2,716	2,704
Mittel	—	**2,731**	**2,747**	**2,747**	**2,732**	**2,712**	**2,704**
RbCl	18,5	2,777	2,773	2,786	2,829	2,889	—
RbCl	17,5	2,751	2,770	2,777	2,788	2,803	—
Mittel	—	**2,764**	**2,772**	**2,782**	**2,809**	**2,846**	—
LiCl	18,0	2,720	2,720	2,729	2,715	2,701	—
LiCl	18,0	2,720	2,720	2,731	2,717	2,707	—
Mittel	—	**2,720**	**2,720**	**2,730**	**2,716**	**2,704**	—

Lösung ist daher nicht mehr eine Konzentrationskette im strengen Sinne; die elektrolytischen Lösungsdrucke der beiden Elektroden sind einander nicht ganz gleich. Wenn wir eine solche Kette dennoch als Konzentrationskette behandeln, d. h. wenn wir die elektrolytischen Lösungsdrucke der beiden Elektroden einander gleichsetzen, so erhalten wir unter Umständen einen „Aktivitätsfaktor“ > 1.

b) Saure Pufferlösungen.

Etwas anders gestaltet sich der Einfluß der Neutralsalze, wenn man sie zu verdünnten Pufferlösungen zugibt. In verdünnten HCl-Lösungen ist die Säure stets total dissoziiert, der Einfluß der Salze ist eine reine Beeinflussung der *Aktivität* der H-Ionen. Fügt man aber zu einem Acetatpuffer ein Neutralsalz, so ist der Einfluß des Salzes ein doppelter. Erstens wird die Aktivität der Acetationen, zweitens die der H-Ionen geändert, und zwar ist der Betrag der Änderung für die Acetationen und für die H-Ionen wahrscheinlich verschieden; dadurch wird das Dissoziationsgleichgewicht der Essigsäure verschoben; es wird gleichsam die Dissoziationskonstante der Essigsäure vergrößert. In der Tat ist der Einfluß der Salze bei Puffern (Acetat- oder Lactatpuffern) deutlich verschieden von dem bei der HCl, wie die folgenden Tabellen und Diagramme zeigen. Die bei der HCl auffällige Sonderstellung des Na verschwindet hier, die Ionenreihe ist einfach die natürliche Reihe

Rb K Na Li,

und zwar in dem Sinne, daß Rb am schwächsten, Li am stärksten wirkt. Dies gilt in gleicher Weise für Acetat- wie für Lactatpuffer und, wie

wir unter Benutzung der früheren Untersuchung von *Michaelis* und *Krüger* hinzufügen können, auch für Phosphatpuffer.

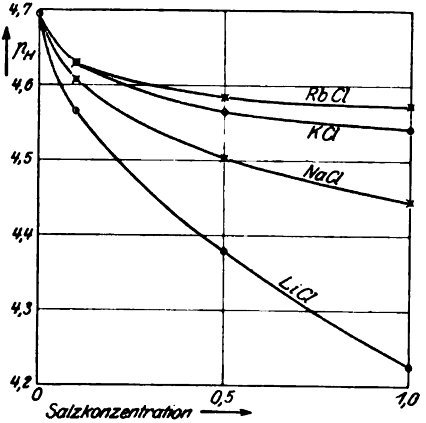


Abb. 3. Abszisse: Konzentration des Salzes, welches einem Gemisch von n/100 Essigsäure + n/100 Natriumacetat zugefügt wird. Ordinate: p_H.

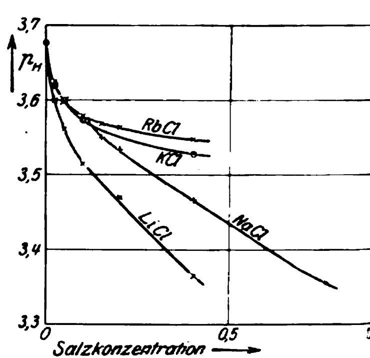


Abb. 4. Wie Abb. 3, nur ist statt Essigsäure setzen Milchsäure, statt Natriumacetat Natrium-lactat.

Die folgenden Berechnungen (Tabelle IV und V) wurden auf das p_H des Standardacetats = 4,607 bezogen. Bei unseren Messungen wurde es so eingerichtet, daß das Verhältnis von Alkalisalz zu freier Säure immer 1 : 1 beträgt. Daher kann man die gemessene $[H^{\cdot}]$ gleich der Dissoziationskonstante (eventuell der auf den jeweiligen Salzgehalt „reduzierten" Dissoziationskonstante) setzen.

Tabelle IV. p_H der m/100 Lösung von Natriumacetat + Essigsäure.

Arten der Salze	Temperatur (°C)	Konzentration der zugesetzten Salze 0,1 n	0,5 n	1,0 n	ohne Salz
	14,5	—	—	—	4.695
	14,5	—	—	—	4.695
Mittel	—	—	—	—	4.695
NaCl	14,5	4,606	4,503	4,444	—
NaCl	14,5	4,608	4,503	4,448	—
Mittel	—	4,607	4,503	4,446	—
KCl	14,5	4,630	4,572	4,542	—
KCl	14,5	4,630	4,572	4,542	—
Mittel	—	4,630	4,572	4,542	—
LiCl	14,5	4,566	4,379	4,223	—
LiCl	14,5	4,568	4,379	4,229	—
Mittel	—	4,567	4,379	4,226	—
RbCl	14,5	4,630	4,588	4,575	—
RbCl	14,5	4,630	4,586	4,569	—
Mittel	—	4,630	4,587	4,572	—

Tabelle V.

p_H der m/100 Lösung von Natriumlaktat + Milchsäure.

Arten der Salze	Temperatur (°C)	Konzentration der zugesetzten Salze							Ohne Salz
		0,02 n	0,05 n	0,1 n	0,15 n	0,2 n	0,4 n	0,8 n	
NaCl . . .	13,0	—	—	3,589	3,554	3,541	3,471	3,365	3,677
NaCl . . .	13,0	—	—	3,575	3,543	3,527	3,451	3,345	3,693
NaCl . . .	13,0	—	—	3,588	3,554	3,531	3,461	3,364	3,702
NaCl . . .	19,0	—	—	—	—	—	3,472	—	3,654
Mittel . . .	—	—	—	3,584	3,550	3,533	3,467	3,358	—
KCl	19,0	—	—	—	—	—	3,529	—	3,654
KCl	19,5	3,619	3,598	3,573	—	—	—	—	3,655
Mittel . . .	—	3,619	3,598	3,573	—	—	3,529	—	—
LiCl . . .	19,0	—	—	—	—	—	3,365	—	3,654
LiCl . . .	19,5	3,600	3,560	3,516	—	3,452	3,666	—	3,655
Mittel . . .	—	3,600	3,560	3,516	—	3,452	3,666	—	—
RbCl . . .	19,0	—	—	—	—	—	3,541	—	3,654
RbCl . . .	19,5	3,624	3,602	3,581	3,569	3,564	3,557	—	3,655
Mittel . . .	—	3,624	3,602	3,581	3,569	3,564	3,549	—	3,676

Das einzige Auffällige ist nur bei den Versuchen mit Lactaten, daß die NaCl-Kurve ganz am Anfang die Kurven für RbCl und KCl überkreuzt. Da nur ein einziger (wenn auch mehrfach bestätigter) Versuchspunkt diese Kreuzung notwendig erscheinen läßt, möchten wir doch als wahrscheinlich hinstellen, daß hier ein systematischer, unerkannter Versuchsfehler vorliegt; weder bei Acetat noch bei Phosphat[1]) zeigte sich ein solches abnormes Verhalten. Man vergegenwärtige sich, daß ein Versuchsfehler von nur 1 Millivolt dieses Resultat hervortäuschen kann.

5. Der Einfluß der Salze auf die H-Ionenaktivität in NaOH.

Eine etwa n/10 CO_2-freie Natronlauge wurde nach der Vorschrift von *Sörensen* aus gesättigter Lauge bereitet, mit CO_2-freiem Wasser kurz vor dem Gebrauch zu geeigneter Konzentration verdünnt und unter möglichsten Kautelen gegen Verunreinigung durch die CO_2 der Luft behandelt. Hierbei erwies sich als notwendig, den Wasserstoff außer der gewöhnlichen Reinigung (Permanganat, Sublimat) auch noch mit Lauge zu waschen, um die letzten Reste CO_2 zu entfernen. Bevor wir diese Vorsichtsmaßregel anzuwenden gelernt hatten, erlebten wir es nicht selten, daß das Potential bei wiederholtem Durchleiten des H_2 wenig, aber deutlich und immer weiter abfiel. Nach Anwendung dieses Kunstgriffes dagegen stellte sich die Lauge genau

[1]) *L. Michaelis* und *A. Krüger*, l. c.

so schnell und sicher ein wie HCl. Die Resultate finden sich in der Tabelle VI und im Diagramm Abb. 5.

Tabelle VI.

Temperatur 17,0°.

Konzentration der Lauge in Mol/Liter	P. D. der Lauge gegen die Standardacetat-Elektrode beobachtet (Millivolt) 1. Versuchsreihe	2. Versuchsreihe	P. D. (berechnet f. d. konstanten Aktivitätsfaktor = 1)	P. D. Differenz berechneter Wert minus beobachteter Mittelwert (Millivolt)	p_H (aus dem beobachteten Mittelwert)
$^1/_{10}$	486,7	486,7	(489,9)	+ 3,2	13,142
$^1/_{30}$	461,7	461,7	462,4	+ 0,7	12,636
$^1/_{50}$	—	450,2	449,6	— 0,6	12,436
$^1/_{80}$	—	438,7	437,8	— 0,9	12,237
$^1/_{100}$	433,0	432,7	432,2	— 0,5	12,105
$^1/_{300}$	404,4	404,7	404,7	0	11,618
$^1/_{500}$	—	391,7	391,8	+ 0,2	11,396
$^1/_{1000}$	373,0	373,0	374,5	(+ 1,5)	(11,071)
$^1/_{2000}$	354,4	353,0	(356,8)	(+ 3,1)	(10,737)
$^1/_{3000}$	343,4	337,4	(347,0)	(+ 6,6)	(10,593)

Innerhalb des Intervalls von n/30 bis n/500 Lauge sind wir auf Grund der Messungen nicht imstande zu behaupten, daß der Aktivitätskoeffizient der H˙-Ionen einen Gang habe, und wir bestätigen das Resultat, welches wir für HCl-Lösungen gewonnen hatten, auch für NaOH-Lösungen. Die gröberen Abweichungen bei den höchsten Verdünnungen sind durch unvermeidliche Verunreinigungen mit CO_2, welche trotz aller Vorsichtsmaßregeln zu erwarten sind, wohl erklärt.

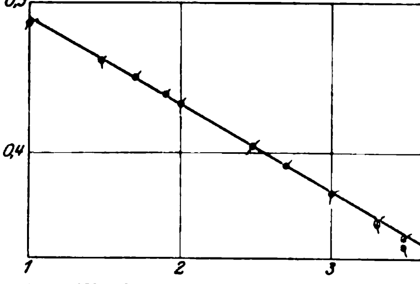


Abb. 5. Wie Abb. 1, nur ist statt HCl zu setzen NaOH.

Die zweite Frage ist nun, wie die Aktivität der *OH-Ionen* sich hier verhält. Wir haben bisher keine zuverlässige elektrometrische Methode, um dies zu untersuchen, da es eine verläßliche Sauerstoffelektrode leider bisher nicht gibt, wenigstens für die hohen Ansprüche an Exaktheit, die man für diese Frage stellen muß. Wir werden hierauf bei dem Kapitel der Dissoziationskonstante des Wassers zurückkommen.

Der Einfluß der *Neutralsalze* auf die H˙-Ionenaktivität in NaOH wurde nur in einer Serie mit NaCl untersucht, und es zeigte sich, daß dieser Einfluß viel größer ist als bei HCl. Bei der Deutung dieses Ergebnisses stoßen wir auf eine große Schwierigkeit. Durch die Konzentration der gelösten Na˙-Ionen ist naturgemäß direkt nur die Konzentration und Aktivität *der OH′-Ionen* festgelegt; die Aktivität der H˙-Ionen richtet sich sekundär erst nach den OH′-Ionen. Der starke

Gang der H'-Aktivität dürfte also wohl so zu erklären sein, daß die OH'-Aktivität viel stärker von der NaCl-Konzentration abhängig ist, als die H'-Aktivität gemäß den Versuchen mit HCl, und daß die sekundäre Folge hiervon ein starker Gang der H'-Konzentration mit steigendem Salzzusatz ist.

Die Versuche ergaben nämlich:

Tabelle VII.

Temperatur °C	P.D. gegen die gesättigte Kalomelelektrode (Millivolt)			
	n/500 NaOH	n/500 NaOH + 0,1 n NaCl	n/500 NaOH + 0,15 n NaCl	n/500 NaOH + 0,2 n NaCl
18,0	906,5	898,0	897,2	896,3
18,5	906,0	899,0	897,5	897,0
19,0	906,8	899,5	897,5	896,2
20,5	905,8	898,5	897,0	895,5
22,5	905,0	898,5	896,0	895,5
Mittel: 19,7	906,0	898,7	897,0	896,1

In Abb. 6 ist dieses Verhalten in folgender Weise graphisch dargestellt. Die Abszisse ist die Konzentration des NaCl, die Ordinate der Potentialunterschied der NaCl-haltigen n/500 NaOH gegen die reine n/500 NaOH. Zum Vergleich ist in dieselbe Abb. 6 nach Maßgabe der oben beschriebenen Versuche die Kurve für n/500 HCl mit steigendem Zusatz von NaCl eingetragen. Auf einem anderen Ordinatenmaßstab dieses Diagramms ist der Potentialunterschied in den p_H-Unterschied transformiert. Man erkennt, wie verschieden sich die p_H-Änderung durch Salzzusatz einerseits in HCl, andererseits in NaOH verhält.

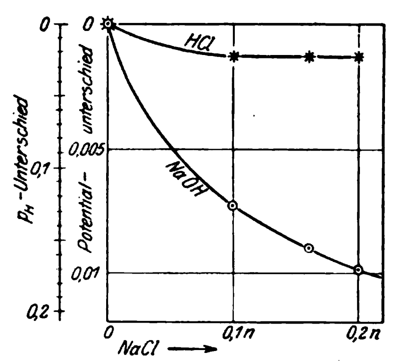


Abb. 6. Abszisse: Konzentration des NaCl, welche einer n/500 HCl (obere Kurve) bzw. einer n/500 NaOH (untere Kurve) zugefügt werden. Ordinate: Potentialunterschied (bzw. p_H-Unterschied) gegen die salzfreie Säure bzw. Lauge.

Demgegenüber erinnern wir jetzt nochmals an den Befund, daß in salz*freier* NaOH innerhalb des Konzentrationsbereichs von etwa n/30 bis n/1000 ein Gang des Aktivitätsfaktors der H-Ionen nicht zu bemerken war. Wir dürfen mit einiger Wahrscheinlichkeit daraus schließen, daß in diesem Bereich auch der Aktivitätsfaktor der OH-Ionen keinen merklichen Gang hat; anderenfalls hätte nämlich die Dissoziationskonstante des Wassers in diesem Bereich der Laugenkonzentration einen Gang, und das ist recht unwahrscheinlich (siehe

weiter unten.) Hieraus dürfen wir wiederum schließen, daß wenigstens in salzfreier Lösung die Lauge *in diesem Konzentrationsbereich* sich ebenso wie HCl verhält, d. h. daß sie nicht nur total dissoziiert ist, sondern daß auch die *OH'-Ionen stets praktisch den Aktivitätsfaktor 1 haben*. Dieser Schluß ist nicht vollkommen überzeugend; aber eine andere Methode, um über die Aktivität der OH-Ionen durch Potentialmessungen Aufschluß zu erhalten, besitzen wir vorläufig nicht, und wir *setzen deshalb im folgenden die Aktivität der OH-Ionen in einer sehr verdünnten salzfreien NaOH genau gleich der Konzentration der Lauge.*

6. Die Dissoziationskonstante des Wassers.

Nunmehr haben wir alle Daten, um die Dissoziationskonstante des Wassers, k_w, wenigstens bei Abwesenheit größerer Salzmengen zu berechnen. Denn wir können z. B. in einer n/500 NaOH nach den vorangegangenen Kapiteln sowohl die Aktivität der H-Ionen wie der OH-Ionen bestimmen. Berechnen wir k_w unter Zugrundelegung von NaOH verschiedener Konzentration, so ergibt sich mit Benutzung der Daten von Tabelle VI:

Tabelle VIII.

Temperatur 17,0° C.

Konzentration der NaOH	p_H nach Tabelle VI	p_{OH} berechnet n. Kapitel 5	$p_H + p_{OH} = pk_w$	Bemerkung
$^1/_{10}$	13,142	1,000	[14,142]	Verworfen wegen zu hoher Konzentration der Lauge
$^1/_{30}$	12,636	1,477	14,113	*Mittelwert:* pk_w *bei 17° C* = **14,114**; mittlerer Fehler = ± 0,02
$^1/_{50}$	12,436	1,699	14,135	
$^1/_{80}$	12,237	1,903	14,140	
$^1/_{100}$	12,105	2,000	14,105	
$^1/_{300}$	11,618	2,477	14,095	
$^1/_{500}$	11,396	2,699	14,095	
$^1/_{1000}$	11,071	3,000	[14,071]	Verworfen wegen zu niederer Konzentration der Lauge (CO_2-Verunreinigung!)
$^1/_{2000}$	10,737	3,301	[14,038]	
$^1/_{3000}$	10,593	3,477	[14,070]	

Die Grundannahmen, auf denen diese Berechnung beruht, sind, daß sowohl in einer HCl wie in einer NaOH von der Konzentration < n/30 die Dissoziation total und der Aktivitätsfaktor der H˙- und der OH˙-Ionen praktisch gleich 1 sei. Die letztere Annahme ist zweifellos nicht völlig exakt; die Berücksichtigung dieses Umstandes bewirkt, daß unser Wert für pk_w nur als Minimalwert zu betrachten ist. Nehmen wir z. B. an, daß der Aktivitätsfaktor sowohl für die H˙-Ionen der HCl, wie für die OH'-Ionen der NaOH je gleich 0,95 sei, so würde das den Wert von pk_w um 0,044 erhöhen. Wir dürfen also die zweite

Dezimale unseres Wertes als um einige Stellen unsicher betrachten, und zwar wahrscheinlich eher um einige Stellen zu klein als zu groß, und setzen daher für

$$17^0: \; pk_w = 14{,}13,$$
$$18^0: \; pk_w = 14{,}10,$$

und kommen daher zu fast demselben Resultat wie *Sörensen* (14,14 für 18⁰) und *Michaelis* (14,13 für 18⁰) auf Grund der früheren Messungen, denen Leitfähigkeitsdaten zur Berechnung der Dissoziationsgrade zugrunde gelegt worden waren. Es folgt daraus das sehr angenehme Resultat, daß die früheren Werte von k_w ohne Korrektur weiter benutzt werden dürfen.

7. Der Einfluß der gelösten Elektrolyte auf die Dissoziationskonstante des Wassers.

Die soeben gewonnenen Werte für k_w sind durch Messungen an sehr verdünnter und salzfreier Lauge gewonnen. Es fragt sich nun, ob und in welchem Betrage k_w durch gelöste Salze beeinflußt wird. Das Problem scheint zunächst leicht lösbar, wenn wir p_H und p_{OH} in einer salzhaltigen, verdünnten Lauge experimentell bestimmen. Für p_H ist dies auch leicht ausführbar; aber, wie wir sahen, gibt es keine direkte elektrometrische Methode, um p_{OH} zu messen. Die Annahmen, welche in verdünnter salz*freier* Lauge p_{OH} zu berechnen gestatteten, treffen für salzhaltige Lauge nicht mehr zu. Wir brauchten also notwendigerweise eine exakt arbeitende Sauerstoffelektrode, und diese besitzen wir nicht. Somit ist die gestellte Frage bisher auf experimentellem Wege nicht zu lösen.

Es sei daher der Versuch einer *theoretischen* Lösung auf Grund der Thermodynamik gestattet. Die Erfahrung zeigt, wie wir sahen, daß eine Kette etwa von der Art

$$H_2,\ Pt \;\Big|\; \underbrace{0{,}001\ n\ HCl}_{\text{Lösung A}} \;\Big|\; \underbrace{\begin{matrix}0{,}001\ n\ HCl\\ +\,0{,}1\ n\ NaCl\end{matrix}}_{\text{Lösung B}} \;\Big|\; H_2,\ Pt$$

eine gewisse, von null verschiedene elektromotorische Kraft hat, selbst unter der Voraussetzung, daß das Diffusionspotential an der Grenze A/B durch Einschaltung geeigneter Flüssigkeitsverbindungen völlig vernichtet ist. Als Ursache für diese EMK nahmen wir an, daß die Aktivität der von der HCl herrührenden H-Ionen durch das Salz verändert werde.

Denken wir uns folgende Anordnung. Lösung A und Lösung B seien voneinander durch eine Membran getrennt, welche Wasser und die H˙- und OH′-Ionen durchlasse, aber keinerlei andere Ionenarten.

Eine solche Membran wird durch eine dünne *Glas*wand nahezu realisiert, wenn wir der Theorie von *F. Haber* über das Wesen der Glaskette folgen. Dieser erklärt die elektromotorische Wirksamkeit einer Glaswand, welche zwischen zwei Lösungen verschiedener Azidität eingeschaltet ist, damit, daß er das Glas für Wasser und dessen Ionen, nicht aber für andere Ionen durchlässig betrachtet. — Das Niveau der beiden Lösungen rechts und links von der Glaswand stellen wir so ein, daß der Unterschied des osmotischen Druckes kompensiert ist, so daß keine Wasserendosmose stattfindet. Nun stecken wir in Lösung A und B je eine H_2-Pt-Elektrode. Schließen wir diese metallisch, so kann kein elektrischer Strom fließen, solange das System isotherm ist, weil chemisches Gleichgewicht herrscht. Da aber die beiden Elektroden ohne die Glasmembran, wie wir sahen, eine P. D. gegeneinander haben, muß die Glasmembran der Sitz einer entgegengesetzt gleichen P. D. sein. Ein solches Membranpotential kann nun auch nach der *Donnan*schen Theorie behandelt werden, mit der Modifikation, daß wir die Ionenaktivitäten statt der Konzentrationen einsetzen, und diese sagt aus, daß das Membranpotential ε

$$\varepsilon = RT ln \frac{a_1}{a_2} = RT ln \frac{b_2}{b_1},$$

wo a_1 die Aktivität einer *permeablen, sonst aber beliebigen* positiven Ionenart diesseits der Membran, a_2 dieselbe jenseits der Membran ist, und wo b_1 die Aktivität einer permeablen, sonst aber beliebigen negativen Ionenart diesseits, b_2 jenseits der Membran ist. Sei also a bezogen auf H-Ionen, b auf OH-Ionen, so folgt

$$\frac{a_1}{a_2} = \frac{b_2}{b_1}$$

oder

$$a_1 b_1 = a_2 b_2.$$

In Worten: *Das Ionenprodukt des Wassers, d. h. k_w, ist unabhängig vom Salzgehalt.*

Vielleicht ist es aber nicht berechtigt, die Realisierbarkeit einer nur für H- und OH-Ionen durchlässigen Membran anzunehmen; möglicherweise ist die Glasmembran überhaupt *nur* für H-Ionen, nicht für OH-Ionen durchlässig. Für diesen Fall gibt es eine andere thermodynamische Überlegung, welche zu dem gleichen Resultat führt. Denken wir uns eine Knallgaskette, also eine Kette aus einer Wasserstoff- und einer Sauerstoffelektrode, welche wir in *eine*, aber eine *beliebige* Lösung tauchen. Die EMK dieser Kette ist unabhängig von der Natur dieser beliebigen Lösung, sofern nur der Wasserdampfdruck über derselben praktisch gleich bleibt. Ist diese Lösung einmal

eine dünne, salzfreie Mineralsäurelösung, ein zweites Mal dieselbe Lösung mit Zusatz eines Neutralsalzes, so wissen wir, daß die EMK der Kette durch das Salz nicht geändert wird, daß aber das Potential der H_2-Elektrode geändert wird. Also muß auch das Potential der O_2-Elektrode sich um den gleichen Betrag ändern. Berücksichtigen wir die Vor zeichen dieser Änderungen und schreiben wir die Änderung des H_2-Potentials einer Verringerung der H-Ionen-Aktivität um einen bestimmten Bruchteil zu, so müssen wir notwendigerweise sagen, daß die Aktivität der OH-Ionen um den gleichen Bruchteil zunimmt. Natürlich ist dies eine reine Rechenmanipulation, wie ja wahrscheinlich die Annahme einer bestimmten OH'-Konzentration in einer sauren Lösung überhaupt nur eine Rechengröße bedeutet. Das Resultat ist jedenfalls, daß das Produkt der Ionenaktivitäten des Wassers unabhängig vom Salzgehalt ist, solange die durch den Salzzusatz bewirkte relative Änderung des Dampfdrucks des Wassers vernachlässigt werden kann.

In der Physiologie ist das Bedürfnis der Kenntnis von k_w in salzhaltigen Lösungen größer als das in fast salzfreien Lösungen. Erst die letzteren Betrachtungen geben uns die Berechtigung, die für salzarme Lösungen gefundenen Werte von k_w auf physiologische Salzlösungen anzuwenden; eine einwandfreie, direkt *experimentelle* Messung von k_w in salzhaltigen Lösungen ist bis heute nicht exakt möglich.

Über die Diastase aktivierende Kraft des Serums. Zugleich ein Beitrag zur Frage über die Rolle des Pankreas im Kohlenhydratstoffwechsel.

Von

Torao Koga (Osaka, Japan).

(Aus der chemischen Abteilung des Rudolf-Virchow-Krankenhauses zu Berlin.)

(Eingegangen am 20. Juli 1923.)

Wenn man menschlichen Speichel oder Duodenalsaft, der ja in der Hauptsache aus Pankreassaft besteht, auf Amylase untersucht, so findet man stets große Mengen dieses Ferments in ihm enthalten. Seine Wirkung aber ist noch keineswegs eine optimale. Denn es gelingt, durch Zusatz von Kochsalz den Effekt um etwa 100 Proz. zu erhöhen. Eine noch weit größere Wirkung erzielt man aber, wenn man statt in Gegenwart von Kochsalz die Amylase dieser Sekrete in Gegenwart von verdünntem Blutserum wirken läßt. Stellt man beispielsweise nach dem Verfahren von *Wohlgemuth* einen Reihenversuch mit destilliertem Wasser und einen zweiten Reihenversuch mit verdünntem Serum an, so findet man, daß die Wirkung der Serumreihe meist achtmal so stark ist wie die Wasserreihe. Es genügen schon ganz geringe Mengen Serum, um diesen Effekt zu erzielen.

Auf diesen enorm aktivierenden Einfluß des Blutserums auf Speichel- und Pankreasdiastase hat bereits *Wohlgemuth*[1]) aufmerksam gemacht, und er hat gezeigt, daß ebenso wie Serum auch Organpreßsäfte befähigt sind, die Amylase in hohem Maße zu aktivieren. Über dieses wirksame Agens des Serums herrscht aber bis jetzt noch keine Klarheit. Ich habe mich deshalb zunächst bemüht, die Natur und die Eigenschaft dieses Aktivators näher zu erforschen.

Bei seinen diesbezüglichen Versuchen hat *Wohlgemuth*[1]) als Diastaselösung normalen Menschenpankreassaft benutzt, bei allen hier angeführten Versuchen habe ich statt menschlichen Pankreassaftes eine 2proz. Pankreatinlösung als Standardlösung verwendet, die in folgender

---

[1]) *J. Wohlgemuth*, diese Zeitschr. **33**, 303, 1911.

Weise hergestellt wurde. Eine bestimmte Menge von Pankreatinpulver — 2 g — wurden in 50 ccm destillierten Wassers aufgelöst und alle 15 Minuten während mehrerer Stunden gut durchgeschüttelt, dann 24 Stunden im Eisschrank aufbewahrt. Am nächsten Tage wurde die Lösung scharf zentrifugiert und die klar erhaltene Flüssigkeit abgegossen und mit Glycerin bis auf 100 ccm gebracht, und dann ordentlich durchgemischt und wiederum während einiger Tage im Eisschrank aufbewahrt; dann wurde sie durch Filterpapier abfiltriert und während der Benutzungszeit immer im Eisschrank gehalten.

Die in dieser Weise gewonnene Standardlösung besitzt starke diastatische Eigenschaften; sie wurde wie die menschliche Pankreasdiastase von Kochsalz und Serum ebenfalls in stark positiver Weise beeinflußt. Als Prüfungsmethode der aktivierenden Wirkung von Serum, Kochsalz und anderen Substanzen habe ich stets die Methode von *Wohlgemuth*[1]) angewandt.

Bei der Prüfung des Aktivierungsvermögens von Kochsalz und von Serum bin ich stets so vorgegangen, daß ich absteigende Mengen der Pankreatinlösung auf drei Reihen Reagenzgläser verteilte und zu der einen Reihe je 1 ccm einer 1 proz. Kochsalzlösung, zu der zweiten je 1 ccm von zehnfach verdünntem Serum und zur Kontrollreihe je 1,0 ccm destilliertes Wasser zusetzte. Dann beschickte ich alle Gläschen mit 5,0 ccm einer 1 proz. Stärkelösung. Nun kamen die drei Reihen für 1 Stunde in ein Wasserbad von 38° C, und nach Ablauf der Frist wurde der Versuch in der üblichen Weise zu Ende geführt.

Das Resultat eines solchen Versuches findet sich in Tabelle I.

Tabelle I.
Die Wirkung von Serum und NaCl auf die Standardlösung.

Fermentmenge	Reihe 1 + 1,0 1 proz. NaCl	Reihe 2 + 1,0 (1 : 10) Serum	Kontrollreihe + 1,0 H_2O
1,0	+	+	+
0,5	+	+	+
0,25	+	+	+
0,125	+	+	—
0,062	—	+	—
0,031	—	+	—
0,016	—	—	—
0,008	—	—	—
$D^{38^0}_{1\,h} =$	40	160	20

Wie aus diesem Versuche hervorgeht, fällt die diastatische Wirkung bei Gegenwart von Kochsalz zweimal und bei Gegenwart von Serum achtmal stärker aus als bei dem Kontrollversuch ohne einen Aktivator.

[1]) *Wohlgemuth*, diese Zeitschr. 9, 1, 1892.

Die aktivierende Wirkung des Serums ist viermal stärker als diejenige des NaCl. Es zeigen sich hier die gleichen Verhältnisse wie bei der Aktivierung der menschlichen Pankreasdiastase, die ebenfalls unter dem Einfluß von Serum eine vierfache Verstärkung erzeugt, wie aus der Tabelle II hervorgeht.

Tabelle II.
Die Wirkung von Serum auf den menschlichen Duodenalsaft.

Duodenalsaft von Menschen	1 Proz. NaCl 1,0 ccm	Serum (1 : 10) 1,0 ccm	Aq. dest. 1,0 ccm
1,0	+	+	+
0,5	+	+	+
0,25	+	+	+
0,125	+	+	+
0,062	+	+	+
0,031	+	+	+
0,016	+	+	+
0,008	+	+	—
0,004	—	+	—
0,002	—	+	—
0,001	—	—	—
$D_{1\,h}^{38^0} =$	640	2560	320

Wie aus diesem Versuche und anderen zahlreichen Versuchen gleicher Art hervorgeht, übt das Serum eine vierfach stärkere aktivierende Wirkung als Kochsalzlösung auf den menschlichen Duodenalsaft aus. Da auch die Standardlösung durch Serum in gleichem Ausmaß verstärkt wird, habe ich für meine weiteren Versuche stets die Standardlösung benutzt.

Da das Serum außer Kochsalz noch andere Salze enthält, habe ich Versuche angestellt, um die Rolle auch dieser anderen Salze zu ermitteln. Einen ähnlichen Salzgehalt wie das Serum besitzen die Ringer-, Tyrode- und Normosallösung. Für meine Versuche habe ich die letztere gewählt, die in 1 proz. Lösung nach Angaben von *Straub*[1]) genau dem Salzgehalt des Serums entsprechen soll. Um nun ihre Wirkung auf die Diastase zu vergleichen mit der des Serums und mit Kochsalz allein, wurden in der oben beschriebenen Weise drei Versuchsreihen angesetzt, die eine mit je 1,0 ccm zehnfach verdünntem Serum, die zweite mit je 1,0 ccm 1 proz. Normosallösung und die dritte mit je 1,0 ccm 1 proz. Kochsalzlösung. Das Resultat dieser drei Versuche gibt Tabelle III wieder.

Wie aus diesem Versuche hervorgeht, zeigt die 1 proz. Normosallösung bei 38⁰ während einer Stunde eine achtfach stärkere Aktivierung

[1]) *Straub*, Münch. med. Wochenschr. 1920, Nr. 9.

Tabelle III.

Ferment-menge	1 ccm (1 : 10) Serum	+ 1 ccm 1 proz. Normosal	+ 1 ccm 1 proz. ClNa
1,0	+	+	+
0,5	+	+	+
0,125	+	+	+
0,062	+	+	—
0,031	+	+	—
0,016	—	+	—
0,008	—	—	—
$D_{1h}^{38^0} =$	80	160	20

als eine 1 proz. ClNa und eine zweifach stärkere als eine zehnfach verdünnte Serumlösung. Weitere Versuche habe ich angestellt, um die aktivierende Wirkung des Normosals und des Serums bei gleichen Salzkonzentrationen zu vergleichen, da im vorigen Versuche die Salzkonzentration bei der 1 proz. Normosallösung zehnmal größer als bei dem zehnfach verdünnten Serum ist. Zu diesem Zwecke wurde die 1 proz. Normosallösung auf das Zehnfache verdünnt und die gleichen Versuche wie oben ausgeführt. Ein solcher Versuch findet sich in Tabelle IV.

Tabelle IV.

Ferment-menge	+ 1 ccm (1 : 10) Serum	+ 1 ccm (1 : 10) 1 proz. Normosal	+ 1 ccm 1 proz. ClNa
1,0	+	+	+
0,5	+	+	+
0,25	+	+	+
0,125	+	+	—
0,062	+	—	—
0,031	—	—	—
0,016	—	—	—
$D_{1h}^{38^0} =$	80	40	20

Wie aus diesem Versuche hervorgeht, ist die aktivierende Wirkung der 1 proz. Normosallösung nach zehnfacher Verdünnung nur zweimal stärker als Kochsalzlösung, dagegen nur halb so stark wie die zehnfach verdünnte Serumlösung.

Um die Verhältnisse klarer zum Ausdruck zu bringen, habe ich versucht, sowohl von Serum wie von Normosal die kleinste noch eben aktivierende Menge zu ermitteln, und habe mich dabei des Einreihenverfahrens nach *Wohlgemuth*[1]) bedient. Ich bin dabei so vorgegangen, daß ich zunächst die Limesmenge der Standardlösung feststellte. Unter der Limesmenge verstehe ich mit *Wohlgemuth* diejenige Fermentmenge, bei der in einstündiger Versuchsdauer 5,0 ccm 1 proz. Stärkelösung nicht ganz bis zum Erythrodextrin abgebaut wurde, wo also auf Zusatz

[1]) *J. Wohlgemuth*, Grundriß der Fermentmethoden, Berlin, Verlag Julius Springer 1913, S. 50.

von Jod die erste blaue bzw. violette Farbe in der ganzen Reihe auftritt. Für meine Standardlösung ergab sich unter Verwendung von 1 proz. Kochsalzlösung zur Herstellung der Verdünnungen meistenteils das fünfte Gläschen der Reihe als Limes mit einem Fermentgehalt von 0,062 ccm. Das entspricht einer 16fachen Verdünnung. Alsdann wurde mit dem zu untersuchenden Serum eine absteigende Reihe in der üblichen Weise unter Verwendung von Kochsalz angesetzt, zu jedem Gläschen 1,0 ccm der 16fach verdünnten Standardlösung und 5,0 ccm einer 1 proz. Stärkelösung zugefügt und der Versuch wie sonst zu Ende geführt. Als Beleg führe ich vier solcher Versuche mit verschiedenen menschlichen Sera an.

Tabelle V.

Serummenge	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3	Versuch 4
1,0	+	+	+	+
0,5	+	+	+	+
0,25	+	+	+	+
0,125	+	+	+	+
0,062	+	+	+	+
0,031	+	+	+	+
0,016	+	+	+	+
0,008	—	+	—	+
0,004	—	—	—	—
kleinste Menge	0,016	0,008	0,016	0,008

Aus Tabelle V geht hervor, daß im Versuche 1 und 3 das Serum noch bei einer Menge von 0,016 ccm, im Versuche 2 und 4 sogar noch bei einer Menge von 0,008 ccm imstande war, eine deutliche Aktivierung zu bewirken. Diese kleinste Serummenge, die noch befähigt ist, die Standardlösung sichtlich zu beeinflussen, gilt als Aktivierungseinheit (A.-E.), und wir berechnen nun, wieviel solcher Einheiten (A.-E.) in 1,0 ccm Serum enthalten sind. Es ergibt sich da für den Versuch 1 und 3 der Wert A.-E. = 62,5 und für den Versuch 2 und 4 A.-E. = 125.

In der gleichen Weise habe ich nun zu verschiedenen Malen die Aktivierungseinheiten für Normosal (1 Proz.) bestimmt und bin bei Verwendung der gleichen Standardlösung stets zu dem Resultat gekommen A.-E. = 8. Wir ersehen hieraus erst mit voller Deutlichkeit, eine wie große Spannung zwischen der aktivierenden Kraft des Serums und der Normosallösung liegt. Den Versuch 1 und 3 übertreffen die Sera um das Achtfache, in Versuch 2 und 4 sogar um das 16fache der Normosalwirkung.

Hieraus ergibt sich die notwendige Schlußfolgerung, daß im Serum neben den Salzen noch andere Substanzen enthalten sein müssen, die auf die Diastase aktivierend wirken. Der Aufgabe, die Natur dieser

Substanzen zu ermitteln, dienten die nunmehr folgenden Untersuchungen.

Um mich genauer über die Natur und Eigenschaften der aktivierend wirkenden Stoffe des Blutserums zu orientieren, habe ich zuerst mit Hilfe der Dialyse versucht, die Salze des Blutserums zu entfernen, und zwar in folgender Weise.

Frisches Menschenserum wird einmal mit Wasser auf das Zehnfache verdünnt, in einer anderen Portion mit physiologischer Kochsalzlösung die gleiche Verdünnung ausgeführt. Beide Portionen werden in einem Pergamentschlauch gesondert gegen destilliertes Wasser 48 Stunden lang dialysiert, wobei das Wasser täglich zweimal erneuert wurde. Nach Beendigung der Dialyse hatte der Inhalt beider Schläuche an Volumen etwas zugenommen und war etwas trübe geworden. Das zur Kontrolle im Eisschrank aufbewahrte Serum, das vorher mit physiologischer Kochsalzlösung auf 1 : 10 verdünnt war, wurde mit H_2O auf das gleiche Volumen gebracht. Und nun wurde im Einreihenverfahren die aktivierende Kraft der beiden dialysierten Portionen und des nativen Kontrollserums in der oben beschriebenen Weise bestimmt. Das Resultat mehrerer solcher Versuche zeigt Tabelle VI.

Tabelle VI.

Menge des Serums	Dialysiertes Serum I	Dialysiertes Serum II	Dialysiertes Serum III	Natives Serum
0,1	+	+	+	+
0,05	+	+	+	+
0,025	+	+	+	+
0,0125	—	—	+	+
0,0062	—	—	—	—
0,0031	—	—	—	—
(A.-E) =	40	40	80	80

Aus diesem Versuche geht deutlich hervor, daß durch die Dialyse nur ein kleiner Teil der aktivierend wirkenden Substanzen des Serums entfernt wird, ein großer Teil jedoch dem Serum erhalten bleibt. Daraus folgt, daß die Stoffe, welche dem Serum die aktivierende Kraft verleihen, nach ihren physikalischen Eigenschaften zum kleinen Teil den Kristalloiden und zum größten Teil den Kolloiden angehören. Bei meinen weiteren Versuchen habe ich mich nun bemüht, die Natur dieser Kolloide näher zu erforschen.

Wie bekannt, sind die kolloiden Substanzen meistens elektrisch geladen, und zwar können sie positiv oder negativ oder auch amphoter geladen sein.

Von diesen Überlegungen ausgehend, habe ich versucht, mit bestimmt geladenen Adsorbenizen auf die Kolloide einzuwirken. Als

Typus eines negativ geladenen Adsorbens gilt das Kaolin, und ich habe zunächst meine Versuche mit dieser Substanz angestellt. Ich ging dabei so vor, daß ich Hundeserum, einerseits ohne Verdünnung, andererseits auf das Zehnfache verdünnt, mit verschiedenen Mengen Kaolin versetzt, während 30 Minuten im Schüttelapparat geschüttelt und nach Ablauf dieser Zeit zentrifugiert habe. Auch das entsprechende Kontrollserum allein habe ich auf 30 Minuten in die Schüttelmaschine gebracht und dann mit den so behandelten Sera den Aktivierungsversuch in der üblichen Weise ausgeführt. Das Resultat geht aus Tabelle VII hervor.

Tabelle VII.

Fermentmenge	+ 1,0 ccm Kaolinserum (1 : 10)	+ 1,0 ccm natives Serum (1 : 10)	+ 1,0 ccm NaCl (1 proz.)
1,0	+	+	+
0,5	+	+	+
0,25	+	+	+
0,125	+	+	—
0,062	+	+	—
0,031	+	+	—
0,016	—	—	—
$D_{1\,h}^{38^0} =$	160	160	20

Wir sehen, daß die Vorbehandlung des Serums mit Kaolin ohne jeden Einfluß auf die aktivierende Kraft des Serums ist. Um jedem Irrtum zu begegnen, habe ich noch mittels des oben beschriebenen Einreihenverfahrens die Aktivatoreinheiten (A.-E.) vor und nach der Behandlung mit Kaolin, dabei mit verschiedenen Verdünnungen des Serums und verschiedenen Mengen Kaolin festgestellt und auch bei dieser Versuchsanordnung keinen Unterschied finden können. Dieses Ergebnis habe ich in zahlreichen Versuchen immer wieder feststellen können, ganz gleichgültig, ob ich das Serum in zehnfacher oder in 20facher Verdünnung mit Kaolin schüttelte, und ob ich Serum vom Menschen oder vom Kaninchen, oder vom Hammel oder vom Hunde untersuchte. Es folgt daraus, daß die aktivierend wirkenden Kolloide des Serums keine positive elektrische Ladung besitzen.

Sodann untersuchte ich, ob dieselben Kolloide vielleicht negativ elektrisch geladen sind. Als Typus eines positiv geladenen Adsorbens gilt das Aluminiumoxyd. Ich benutzte das *Merck*sche Präparat und führte meine Versuche in der Weise aus, daß ich zehnfach verdünntes Serum mit 2 g Fasertonerde eine halbe Stunde lang im Schüttelapparat schüttelte, danach zentrifugierte und das klare Zentrifugat auf seine aktivierende Kraft untersuchte. Zum Vergleich stellte ich einen Versuch mit nativem Serum in der gleichen Verdünnung und einen Kontroll-

versuch mit 1proz. Kochsalzlösung an. Das Ergebnis einer solchen Untersuchung teile ich in Tabelle VIII mit.

Tabelle VIII.

Ferment-menge	+ 1,0 ccm Aluminium-serum (1 : 10)	+ 1,0 ccm natives Serum (1 : 10)	+ 1,0 ccm 1 proz. NaCl
1,0	+	+	+
0,5	+	+	+
0,25	+	+	+
0,125	+	+	—
0,062	+	+	—
0,031	+	+	—
0,016	—	—	—
$D_{1b}^{38^0}$	160	160	20

Auch hier sehen wir zunächst keinen Einfluß der Fasertonerde auf die aktivierende Kraft des Serums. Wenn man dagegen die feinere Methode des Einreihenverfahrens anwendet, tritt doch ein deutlicher Unterschied zutage. Als Beleg führe ich zwei solche Versuche an.

Tabelle IX.

Serum-menge	Versuch I		Versuch II	
	Aluminiumserum	Natives Serum	Aluminiumserum	Natives Serum
0,1	+	+	+	+
0,05	+	+	+	+
0,025	+	+	+	+
0,0125	+	+	—	+
0,0062	—	+	—	—
0,0031	—	—	—	—
A.-E. =	80	160	40	80

Wie aus diesen beiden Versuchen hervorgeht, sind die Aktivierungseinheiten durch Vorbehandlung mit Fasertonerde auf die Hälfte vermindert worden im Vergleich zu dem nativen Serum. Wir dürfen daraus schließen, daß die aktivierend wirkenden Substanzen im Serum wahrscheinlich zum Teil negativ elektrisch geladen sind.

Ich habe nun versucht, noch mit einem anderen positiv geladenen Adsorbens die elektrisch negativen Kolloide des Serums zu fassen, und habe Serum mit kolloidalem Eisen behandelt. Ich ging dabei so vor, daß ich Serum auf das Fünffache mit Kochsalzlösung verdünnte und dann tropfenweise so viel fünffach verdünnte kolloidale Eisenlösung unter starkem Schütteln zugab, daß zum Schluß das Serum auf das Zehnfache verdünnt war. Das wasserklare Filtrat wurden dann nach vorherigem Einengen auf seine aktivierende Kraft mittels Einreihenverfahrens untersucht. Dabei zeigte sich, daß das Serum sein Aktivierungsvermögen bis auf einen geringen Rest eingebüßt hatte.

Wir sind nun nicht berechtigt, hieraus den Schluß zu ziehen, daß die aktivierende Kraft des Serums an die Gegenwart von negativen Kolloiden geknüpft ist. Denn das kolloidale Eisen ist nicht bloß befähigt, aus dem Kolloidgemisch des Serums die negativen Kolloide auszufällen, sondern reißt gleichzeitig auch Kolloide ohne elektrische Ladung zu Boden. Viel eher dürfen wir, wenn wir die Versuche mit Fasertonerde und mit kolloidalem Eisen zusammen betrachten, zu dem Schluß kommen, daß die Mehrzahl der Kolloide des Serums, an welche die aktivierende Eigenschaft geknüpft ist, keine spezifische elektrische Ladung zeigen und nur ein ganz geringer Teil negativ geladen ist.

Gleichzeitig kann der Versuch mit kolloidalem Eisen gelten als eine erfreuliche Bestätigung des oben mitgeteilten Dialysierversuches. Bei letzterem haben wir alle Salze fortgeschafft und dann den kolloidalen Anteil des Serums als stark aktivierend befunden. Beim Behandeln des Serums mit kolloidalem Eisen haben wir umgekehrt die Kolloide eleminiert und die zurückbleibenden Salze als einen verhältnismäßig schwachen Anteil des Serumaktivators erkannt.

Auch mit Kohle wurden Versuche angestellt, um ihren Einfluß auf die aktivierenden Bestandteile des Serums kennenzulernen. Die Versuche fielen aber ganz unregelmäßig aus. Bisweilen hatte das mit Kohle behandelte Serum sein Aktivierungsvermögen stark eingebüßt, mitunter aber auch nach der Behandlung an aktivierender Kraft zugenommen. Dieses rätselhafte Verhalten fand schließlich seine Aufklärung dadurch, daß ich feststellen konnte, daß Extrakte aus der Kohle selber befähigt sind, Diastase in ihrer Wirkung zu verstärken. Ich habe deshalb von weiteren Versuchen mit Kohle Abstand genommen.

Nach diesen ausschließlich physikalischen Charakterisierungsversuchen habe ich mich bemüht, der chemischen Natur des im Serum enthaltenen Aktivators näherzukommen. *Wohlgemuth* hatte in seinen diesbezüglichen Versuchen bereits gezeigt, daß der Aktivator des Serums kochbeständig und alkohollöslich ist.

Ich habe nun zunächst festzustellen versucht, ob dieser Körper zu den Lipoiden in irgend einer Beziehung steht. Wenn das der Fall war, so mußte es gelingen, durch Behandlung des Serums mit irgend einem Lösungsmittel für Lipoide die aktivierende Kraft des Serums zum mindesten abzuschwächen, wenn nicht auch ganz aufzuheben.

Zu dem Zwecke wurden 10 ccm Serum in einem Scheidetrichter mit je 20 ccm Äther mehrmals gründlich geschüttelt und nach dem Absitzen der Äther von dem Serum getrennt. Die Ätherextrakte wurden vom Äther auf dem Dampfbade befreit und der Rückstand in warmem Wasser aufgenommen. Dieser wurde dann wie das behandelte Serum auf seine aktivierende Kraft gesondert untersucht. Dabei zeigte sich,

daß das Serum von seinem Aktivierungsvermögen nichts eingebüßt hatte, während in dem ätherischen Extrakt keine Spur einer Aktivierung festgestellt werden konnte.

Das gleiche negative Ergebnis hatten Extraktionsversuche des Serums mit Petroläther.

Sodann habe ich noch Versuche mit Emulsionen von reinem Lecithin angestellt und entsprechend dem obigen Befunde stets negative Resultate gehabt. Hiernach dürfte wohl der Schluß berechtigt sein, daß der Aktivator des Serums nichts mit Lipoiden zu tun hat.

Zur weiteren Charakterisierung des Aktivators habe ich seine Widerstandsfähigkeit gegen *NaOH* und *HCl* geprüft. Zu diesem Zwecke habe ich in fünf verschiedenen Portionen je 2 ccm Serum mit 1 ccm n/10 NaOH versetzt und bei Zimmertemperatur stehengelassen. Nach Ablauf von 10 Minuten, 30 Minuten, 1 Stunde, 24 Stunden und 48 Stunden wurde mit 1,0 ccm n/10 HCl neutralisiert und nun aktivierende Versuche angestellt. Dabei war eine Abschwächung der aktivierenden Kraft nach dieser Vorbehandlung nicht zu beobachten. Sogar durch Kochen derselben Mischung vor der Neutralisation während 10 Minuten und 30 Minuten wird die aktivierende Kraft nicht abgeschwächt. Die gleichartig angestellten Versuche mit n/10 HCl haben ebenfalls keine Abschwächung der aktivierenden Kraft ergeben. Man kann daraus schließen, daß der Aktivator säure- und alkalifest sein muß.

Ich habe dann auch Gelegenheit gehabt, Serum zu untersuchen, das spontan in Fäulnis übergegangen war. Doch auch hier konnte ich trotz der tiefgreifenden Veränderung des Serums kein Schwächerwerden des Aktivators beobachten.

Verhalten der Blutkörperchen.

Bei dem starken Aktivierungsvermögen des Serums lag es nahe, zu untersuchen, ob auch die Blutkörperchen befähigt sind, die diastatische Wirkung zu verstärken. Da doch ein ständiger Austausch zwischen den Bestandteilen des Serums mit denen der Blutkörperchen stattfindet, schienen derartige Versuche aussichtsvoll. Ich stellte deshalb Versuche mit Blutkörperchen verschiedener Herkunft an, und zwar untersuchte ich solche vom Menschen, Hammel und Kaninchen.

Bei den Versuchen ging ich so vor, daß ich zunächst die Blutkörperchen durch scharfes Zentrifugieren von dem Serum befreite und dann noch viermal mit physiologischer Kochsalzlösung wusch. Sodann wurde 1 ccm Blutkörperchen in 9 ccm Wasser aufgelöst, die Lösung nach einigem Stehen und Schütteln filtriert und das Filtrat auf eine aktivierende Kraft geprüft. Das Resultat einiger solcher Versuche sei in Tabelle X mitgeteilt:

Tabelle X.

Blutkörperchenlösung	Vom Menschen	Vom Hammel	Vom Kaninchen
1,0	+	+	+
0,5	+	+	+
0,25	+	+	+
0,125	—	—	+
0,062	—	—	—
A.-E. =	40	40	80

Wie wir aus dieser Tabelle ersehen, besitzen auch die Blutkörperchen eine ziemlich stark aktivierende Kraft; dabei zeigen die Kaninchenblutkörperchen etwas stärkere Wirkung als diejenigen des Menschen und Hammels. Ich habe diese Versuche mehrfach wiederholt und bin stets zu dem gleichen Resultat gekommen.

Verhalten des Harns.

Außer dem Serum und den Blutkörperchen habe ich auch noch den Harn auf eine etwaige Fähigkeit, die Diastase zu aktivieren, untersucht, indem ich von der Annahme ausging, daß ein Übertritt von aktivierender Substanz aus dem Blute in den Harn nicht unwahrscheinlich war. Ich untersuchte deshalb zahlreiche Harne verschiedenster Herkunft auf ihr Verhalten der Diastase gegenüber und fand eigentlich in jedem Falle eine Verstärkung der diastatischen Wirkung durch den Urin. Ich mußte aber dabei die Reaktion des Harns berücksichtigen. Sobald ich nämlich einen stark sauer reagierenden untersuchte, fand ich mitunter eine sehr schwache Aktivierung, bisweilen fehlte sie auch ganz. Wenn ich aber einen solchen Urin genau neutralisierte, war stets eine deutliche Aktivierung zu erkennen. Als Beleg führe ich hierfür drei Versuche an. Die Versuchsanordnung war die gleiche wie beim Serum.

Es wurde zunächst von meiner Standardlösung der Titer ermittelt und dann mit dem nativen, gegen Lackmus sauer reagierenden Harn eine absteigende Reihe angesetzt, zu jedem Gläschen die vorher festgestellte Fermentmenge und ferner 5 ccm einer 1proz. Stärkelösung zugegeben, gleichzeitig wurde mit demselben vorher durch Zusatz von Sodalösung genau neutralisierten Harn in der gleichen Weise ein Versuch ausgeführt. Selbstverständlich wurde stets die durch das Neutralisieren bedingte Verdünnung bei dem nativen Harn durch Zusatz von Wasser ausgeglichen. Das Resultat solcher Versuche veranschaulicht Tabelle XI.

Aus diesem Versuche geht tatsächlich hervor, daß die Reaktion für die aktivierende Kraft des Urins von großer Bedeutung ist. Das konnte ich auch daran sehen, daß, wenn ich gegen Lackmus neutral oder alkalisch reagierende Harne untersuchte, stets optimale Wirkungen

Tabelle XI.

Urinmenge	Versuch I		Versuch II		Versuch III	
	Nativer Urin	Neutralis. Urin	Nativer Urin	Neutralis. Urin	Nativer Urin	Neutralis. Urin
1,0	—	+	+	+	+	+
0,5	—	+	+	+	+	+
0,25	—	+	—	+	+	+
0,125	—	+	—	+	—	+
0,062	—	+	—	+	—	+
0,031	—	—	—	—	—	+
0,0016	—	—	—	—		
A.-E. =	0	16	2	15	4	32

(A.-E. = 16 bis 32) erzielte, ohne daß ich an der Reaktion etwas zu ändern brauchte. Von der Mitteilung von Belegen hierfür möchte ich mit Rücksicht auf den beschränkten Raum Abstand nehmen, wenngleich die Zahl dieser meiner Untersuchungen eine sehr große ist.

Gleichzeitig habe ich dabei beobachtet, daß bei ein und derselben Person nicht unbeträchtliche Schwankungen in der Aktivierungskraft des Urins zu beobachten sind. Eine Gesetzmäßigkeit dafür habe ich nicht feststellen können.

Sodann habe ich den Einfluß von Adsorbenzien auf den Aktivator des Urins untersucht, und einerseits mit Kaolin, andererseits mit Fasertonerde den Urin behandelt. Dabei konnte ich im Gegensatz zum Serum weder bei Kaolin noch beim Aluminiumoxyd ein etwaiges Schwächerwerden beobachten. Endlich habe ich auch die Wirkung der Dialyse auf den Urinaktivator studiert und sauer reagierende Urine 48 Stunden lang gegen fließendes Wasser dialysiert. Nach Beendigung desselben wurde sowohl mit der dialysierten Portion wie mit der nativen je ein Versuch angestellt und gleichzeitig ein dritter mit demselben nativen Urin, der vorher durch Zusatz von Natriumcarbonatlösung gegen Lackmus genau neutralisiert war. Ich möchte bemerken, daß die Urine nach der Dialyse stets neutral gegen Lackmus reagierten. Ich teile in Tabelle XII zwei solcher Versuche mit:

Tabelle XII.

Urinmenge	Versuch I			Versuch II		
	Dialysierter Urin	Nativer Urin		Dialysierter Urin	Nativer Urin	
		sauer	neutralisiert		sauer	neutralisiert
1,0	+	+	+	+	+	+
1,5	+	+	+	+	+	+
0,25	+	+	+	+	—	+
0,125	+	—	+	+	—	+
0,062	—	—	+	+	—	+
0,031	—	—	—	—	—	+
0,016	—	—	—	—	—	—
A.-E. =	8	4	16	16	2	31

Aus dieser Tabelle ist zu ersehen: 1. der Aktivator des Harns nimmt durch Dialyse nur wenig ab. Das beweist, daß der größte Teil des Aktivators im Urin ebenso wie der des Serums kolloidaler Natur ist. 2. ist dabei zu bemerken, daß der dialysierte Urin viel stärker als der sauer reagierende Kontrollurin die Diastasewirkung aktiviert. Außerdem habe ich festgestellt, daß der Urinaktivator auch kochbeständig ist, und er ist unverändert geblieben, wenn auch der Harn stark zersetzt war.

Verhalten der Milch.

Endlich habe ich auch geprüft, ob die Milch imstande ist, die Diastase zu aktivieren. Als Produkt der Milchdrüse, die ihr Material aus dem Blute schöpft, durfte man erwarten, auch bei ihr den Aktivator anzutreffen. In der Tat zeigte sich, daß sie im hohen Maße die Fähigkeit besitzt, die Diastasewirkung zu verstärken. Ich habe für meine Versuche Frauenmilch, Kuhmilch und Ziegenmilch verwandt und habe meist von dem Einreihenversuch Gebrauch gemacht. Die Werte, die ich so für die einzelnen Milcharten ermittelte, waren von fast der gleichen Größenordnung, wie wir sie beim Serum kennengelernt haben.

Als Beleg führe ich aus der Reihe meiner Versuche nur einen von jeder Milchart an.

Tabelle XIII.

Milchmenge	Frauenmilch	Kuhmilch	Ziegenmilch
1,0	+	+	+
0,5	+	+	+
0,25	+	+	+
0,125	+	+	+
0,062	+	+	+
0,031	+	+	+
0,016	—	+	+
0,008	—	+	+
0,004	—	—	—
A.-E. =	31	125	125

Wir sehen aus diesem Versuche, daß die Frauenmilch ein wesentlich geringeres Aktivierungsvermögen besitzt als die beiden anderen Milcharten. Ob das auf den geringen Salzgehalt derselben zurückzuführen ist, oder ob der weit höhere Milchzuckergehalt die aktivierende Kraft beeinträchtigt, oder ob die Menge des eigentlichen Aktivators hier geringer ist, möchte ich dahingestellt sein lassen. Sodann habe ich untersucht, ob auch der Aktivator der Milch kochbeständig und widerstandsfähig gegen Alkali und Säure ist. Ich konnte feststellen, daß noch so langes Erhitzen die aktivierende Kraft der Milch nicht schädigte, und daß noch so langes Behandeln mit Säure (n/10 HCl) und mit Alkali (n/10 NaOH) ohne jeden Einfluß auf den Aktivator blieb.

Über den Einfluß des im Serum befindlichen Aktivators auf den Stoffwechsel.

Im Anschluß an meine Untersuchungen über den Aktivator des Serums habe ich festzustellen versucht, ob die Mengenverhältnisse beim normalen Menschen irgendwelchen Schwankungen unterliegen; sie bewegen sich zwischen A.-E. = 62,5 bis 250, denselben Werten begegnete ich auch bei Fällen von Nephritis, bei Lues mit schwerem Ikterus, bei Kohlenoxydvergiftung, bei Diabetes und bei anderen Erkrankungen. Irgendwelche Besonderheiten ließen sich für keine der untersuchten Krankheiten gegenüber dem normalen Zustande erkennen.

Ich ging dann dazu über, die Verhältnisse am Tiere genauer zu studieren, und benutzte für meine Versuche den Hund. In erster Reihe interessierte mich die Frage, ob der Aktivator sich im Serum in allen Gefäßprovinzen in der gleichen Stärke vorfindet, oder ob hier irgendwelche Differenzen vorkommen. Besonders war mein Augenmerk gerichtet auf das Verhalten des Blutes, das aus dem Pankreas durch die Vena portarum der Leber zufließt. Über diese Untersuchungen ist bereits an anderer Stelle kurz berichtet worden[1]).

Die von uns gewählte Versuchsanordnung war folgende:

Wir ließen zunächst das Tier mehrere Tage hungern. Dann wurde in Äthernarkose mittels eingebundener Glaskanüle oder Spritze Blut entnommen aus der Vena pancreatico-duodenalis, aus der Vena portarum und aus der Vena und Arteria femoralis. Das Blut wurde in Schalen aufgefangen, durch Schlagen defibriniert und sofort scharf zentrifugiert. Mit den vier verschiedenen Sera wurden dann je drei Reihen in der oben beschriebenen Weise angesetzt unter Benutzung einer Standardlösung, die ich mir aus Pankreatin purissimum hergestellt hatte, und von der ich zuvor den Titer für eine 1-, 2- und 24stündige Versuchsdauer ermittelt hatte.

Der Versuch setzte sich somit jedesmal aus zwölf Reihen zusammen.

Eine Reihe von jedem Serum wurde nur 1 Stunde, die andere Serie 2 Stunden im Wasserbade bei 38^0 gehalten, und die dritte Serie kam auf 24 Stunden in den Brutschrank. Diese etwas umständliche Versuchsanordnung schien uns geboten, um keine Differenzen in der Aktivierung zu übersehen. Denn es war immerhin möglich, daß sich irgendwelche Unterschiede in den einzelnen Serien schon nach 1 oder nach 2 Stunden zeigten, bei längerer Ausdehnung des Versuches aber wieder sich ausgeglichen haben konnten. Andererseits konnte auch der Fall eintreten, daß sich erst nach einer Digestion von 24 Stunden ein Unterschied bemerkbar machte. Um allen diesen Möglichkeiten Rechnung zu tragen, wurde in der oben angegebenen Weise verfahren.

---

[1]) *Wohlgemuth* und *Koga*, Klin. Wochenschr. 1923.

Im ganzen stellten wir vier Versuche an drei Hunden an. Von diesen teile ich nur drei mit.

Versuch I.

Mittelgroßer Polizeihund hat 3 Tage gehungert. In Äthernarkose Blutentnahme aus Vena pancreatico-duodenalis, aus Vena portarum, aus Vena und Arteria femoralis. Das Serum wird durch scharfes Zentrifugieren sofort gewonnen und sogleich zum Versuch verwendet.

Tabelle XIV.

Serummenge	V. pancr.-duod.	V. portarum	V. femoralis	A. femoralis
		Versuchsdauer 1 Std.		
0,1	+	+	+	+
0,08	+	—	—	—
0,06	+	—	—	—
0,04	—	—	—	—
0,03	—	—	—	—
A.-E. =	16,7	10	10	10
		Versuchsdauer 2 Std.		
0,1	+	+	+	+
0,08	+	+	+	+
0,06	+	+	+	+
0,04	+	+	—	—
0,03	+	—	—	—
0,02	+	—	—	—
0,015	—	—	—	—
A.-E. =	50	25	16,7	16,7
		Versuchsdauer 24 Std.		
0,1	+	+	+	+
0,08	+	+	+	+
0,06	+	+	+	+
0,04	+	+	+	+
0,03	+	+	+	+
0,02	+	—	—	—
0,015	+	—	—	—
0,01	—	—	—	—
A.-E. =	66,7	33,3	33,3	33,3

Versuch II.

Brauner mittelgroßer Hund von unbestimmbarer Rasse hat 3 Tage gehungert. Blutentnahme in Äthernarkose aus Vena pancreatico-duodenalis, aus Vena portarum, aus Vena und Arteria femoralis. Das Serum wird durch scharfes Zentrifugieren sofort gewonnen und sogleich zum Versuch verwendet (Tab. XV).

Aus diesen beiden Versuchen geht deutlich hervor, daß das Blut der Vena pancreatico-duodenalis wesentlich stärker die Diastase aktiviert als das Serum der anderen Blutarten. Schon nach einstündiger Versuchsdauer zeigte sich diese Überlegenheit und nimmt im Verlaufe der längeren Digestion — nach 2 Stunden — sogar etwas mehr zu und ist auch nach 24 Stunden in demselben Ausmaß zu erkennen. Im

Tabelle XV.

Serummenge	V. pancr.-duod.	V. portarum	V. femoralis	A. femoralis
		Versuchsdauer 1 Std.		
0,08	+	+	+	+
0,06	+	+	+	+
0,04	+	+	+	+
0,03	+	+	+	+
0,02	+	+	+	+
0,015	+	+	+	+
0,01	+	+	+	—
0,008	+	—	—	—
0,006	+	—	—	—
0,004	—	—	—	—
A.-E. =	166,7	100	100	66,7
		Versuchsdauer 2 Std.		
0,08	+	+	+	+
0,06	+	+	+	+
0,04	+	+	+	+
0,03	+	+	+	+
0,02	+	+	+	+
0,015	+	+	+	+
0,01	+	+	+	+
0,008	+	+	—	—
0,006	+	—	—	—
0,004	+	—	—	—
0,003	—	—	—	—
A.-E. =	250	125	100	100
		Versuchsdauer 24 Std.		
0,08	+	+	+	+
0,06	+	+	+	+
0,04	+	+	+	+
0,03	+	+	+	+
0,02	+	+	+	+
0,015	+	+	+	+
0,01	+	+	+	+
0,008	+	+	+	+
0,006	+	—	+	—
0,004	+	—	—	—
0,003	+	—	—	—
0,002	—	—	—	—
0,0015	—	—	—	—
A.-E. =	333,3	125	166,7	125

Gegensatz dazu zeigen die anderen drei Sera untereinander keine Differenzen. Dem minimalen Unterschied bei der zweiten Serie, der zwischen dem Blute der Vena portarum und dem der peripheren Gefäße besteht, möchte ich keine Bedeutung beilegen, zumal er sich nach 24 Stunden wieder fast vollkommen ausgeglichen hat. Zur Erklärung der auffallend kleinen Werte für die Aktivierungseinheiten in dem ersten Versuche möchte ich bemerken, daß sie darin ihren Grund haben, daß ich bei der Herstellung der Verdünnung aus der Standardlösung mich nicht strikte an den eigentlichen Titer gehalten habe, sondern einen viel

weiter darunter liegenden Wert als Titer annahm. Das geschah in der Absicht, mit einer Fermentmenge zu arbeiten, die bei bestimmter Digestionszeit die angewandte Stärkelösung nur gerade so weit veränderte, daß sie in der Hauptsache noch aus Amylodextrin bestand, so daß sie auf Zusatz von Jod eine blaue Farbe gab, auf diese Weise ließen sich die Unterschiede in der Aktivierung weit besser erkennen, als wenn die Kontrolle (Fermentlösung + Stärkelösung) eine violette oder hellviolette oder gar rötliche Farbe zeigte.

Versuch III.

Denselben Hund untersuchte ich acht Wochen später. Während die anderen Tiere an der Verletzung der Vena pancreatico-duodenalis infolge eintretender Gangraen des aus der Zirkulation ausgeschalteten Darmteils und an Pankreasgewebenekrose wenige Tage später zugrunde gingen, hatte dieser Hund die sehr schonend vorgenommene Blutentnahme gut überstanden, machte einen völlig normalen Eindruck und zeigte dauernd Freßlust.

Dieser Versuch sollte dazu dienen, festzustellen, wie der Einfluß nach vorhergegangener Fütterung auf die Zusammensetzung des Pankreasvenenblutes wirkt. Zu dem Zweck bekam der Hund etwa 3 Stunden vor dem Eingriff 250 g rohes Fleisch zu fressen. Die Blutentnahme geschah in der üblichen Weise und die frisch durch starkes Zentrifugieren gewonnenen Sera wurden sofort auf ihre Aktivatormenge in gleichen drei Versuchsserien wie oben untersucht. Das Resultat dieser Untersuchung gibt Tabelle XVI wieder:

Tabelle XVI.

Serummenge	V. pancr.-duod.	V. portarum	V. femoralis	A. femoralis
		Versuchsdauer 1 Std.		
0,1	+	+	+	+
0,08	+	+	+	+
0,06	+	+	+	+
0,04	+	+	+	+
0,03	+	+	+	+
0,02	—	—	—	—
0,015	—	—	—	—
0,01	—	—	—	—
0,008	—	—	—	—
A.-E. =	33,3	33,3	33,3	33,3
		Versuchsdauer 2 Std.		
0,1	+	+	+	+
0,08	+	+	+	+
0,06	+	+	+	+
0,04	+	+	+	+
0,03	+	+	+	+
0,02	+	+	+	+
0,015	—	—	—	—
0,01	—	—	—	—
0,008	—	—	—	—
0,006	—	—	—	—
A.-E. =	50	50	50	50

Tabelle XVI (Fortsetzung).

Serummenge	V. pancr.-duod.	V. portarum	V. femoralis	A. femoralis
	Versuchsdauer 24 Std.			
0,1	+	+	+	+
0,08	+	+	+	+
0,06	+	+	+	+
0,04	+	+	+	+
0,03	+	+	+	+
0,02	+	+	+	+
0,015	+	+	+	+
0,01	+	+	+	+
0,008	+	+	+	+
0,006	—	—	—	—
A.-E. =	125	125	125	100

Im Gegensatz zu den beiden oben mitgeteilten Versuchen sehen wir hier weder nach 1, noch nach 2, noch nach 24 Stunden irgend einen Unterschied zwischen den einzelnen Sera. Das Pankreasvenenblut aktiviert in keiner Weise stärker als das Blut der Vena portarum und der peripheren Gefäße.

Zusammenfassend haben wir also feststellen können, daß beim hungernden Tiere das Blut der Pankreasvene weit stärker die Diastase aktiviert als das Blut der Vena portarum und als das Blut der Vena und Arteria femoralis. Wird dagegen das Tier vor der Blutentnahme reichlich gefüttert, so verschwindet dieser Unterschied und das Pankreasvenenblut aktiviert um nichts stärker als das Blut aus den anderen Gefäßen.

Wenn man nun bedenkt, daß das Blut aus der Pankreasvene auf dem kürzesten Wege über die Vena portarum zur Leber gelangt, so möchte man glauben, daß derartige Verschiebungen in dem Gehalt des Pankreasvenenblutes an aktivierender Substanz nicht ohne Einfluß auf den Bestand der Leberzelle bleiben können. Man darf wohl annehmen, daß bei dem kaum schwankenden Gehalt an Aktivator im peripheren Blute alle Körperzellen auf eine bestimmte Stärke desselben genau eingestellt sind, und man geht wohl auch nicht fehl, wenn man annimmt, daß das auch für die Leberzelle zutrifft. Wenn das der Fall ist, so müssen Änderungen in dem Gehalt an aktivierender Substanz auch Änderungen im Stoffwechsel der Zellen hervorrufen und ganz besonders derjenigen Zellen, auf welche diese Änderung am stärksten einwirkt. Und das sind die Leberzellen. Diese Änderung im Stoffwechsel muß sich dokumentieren als eine verstärkte Wirkung des in ihr enthaltenen diastatischen Ferments und damit als ein gesteigerter Abbau des Glykogens. Nun wissen wir aus den Untersuchungen von *Hofmeister*[1]), daß beim hungernden Kaninchen das Leberglykogen

[1]) *Hofmeister*, Sammlung der von der Notnagelstiftung veranstalteten Vorträge, H. 1. Berlin u. Wien 1913, Urban u. Schwarzenburg.

zunächst in der Peripherie der Leberläppchen verschwindet und schließlich nur in der Zone um die Vena centralis erhalten bleibt. Ganz dasselbe mikroskopische Bild konnten *Wohlgemuth* und *Fukushi*[1]) in der Kaninchenleber hervorrufen, wenn sie den Tieren direkt in eine Mesenterialvene Diastaselösung einspritzten, oder wenn sie auf irgend eine andere Weise dafür sorgten, daß die Diastase im Blute vermehrt war, wie beispielsweise durch Unterbindung des Ausführungsganges des Pankreas. Verschließt man nämlich den Ductus Wirsungianus durch Ligatur, so staut sich das Sekret zunächst in den Drüsengängen und tritt schließlich ins Blut über. Wenn aber große Diastasemengen an die Ablagerungsstätte des Glykogens, also an die Leber gelangen, so bauen sie das Glykogen ab und es verschwindet allmählich aus den Leberzellen.

Wohlgemuth und *Fukushi* konnten nun bei ihren so vorbehandelten Kaninchen genau wie *Hofmeister* in seinen Hungerversuchen beobachten, daß das Glykogen zunächst aus der Peripherie der Leberläppchen verschwindet und noch einige Zeit in der Partie um die Vena centralis erhalten bleibt, um schließlich bei lang anhaltender Steigerung der Diastase im Blute auch aus dieser Gegend zu verschwinden. Es ist demnach das mikroskopische Verhalten des Leberglykogens genau das gleiche, ob man ein Tier hungern läßt, oder ob man durch verstärkte diastatische Wirkung für einen Glykogenschwund in der Leber sorgt. Nun hat sich in unsern Versuchen gezeigt, daß beim Hungern der Aktivator im Pankreasblute ansteigt, daß also im Hunger der Leberzelle ein Impuls in Gestalt des vermehrten Aktivators zugeht. Dieser Impuls kann nur so sich auswirken, daß er die Diastase in der Leberzelle zu gesteigerter Tätigkeit antreibt. Die Folge davon ist der Glykogenabbau bzw. Glykogenschwund.

Was besagt nun dieser Befund bezüglich der Rolle des Pankreas im Kohlenhydratstoffwechsel?

Daß im Hunger die Leber ihren Vorrat an Glykogen ausschüttet, ist so lange bekannt, als man von der Existenz des Glykogens etwas weiß. Wie aber dieser Vorgang zustande kommt, und welche Kräfte dabei eine Rolle spielen, war noch bis heute eine gänzlich ungelöste Frage. Diese Frage nun glauben wir durch unsere Untersuchungen der Lösung nähergebracht zu haben.

Bisher hatte man die dunkle Vorstellung, daß im Hunger der Leber irgend ein Impuls zugeht, vielleicht auf dem Wege der Nervenbahn, ähnlich wie bei dem Zuckerstich, der sie zwingt, ihr Glykogen abzubauen und Zucker an das Blut abzugeben.

---

[1]) *Wohlgemuth* und *Fukushi*, Virchows Arch. f. path. Anat. u. Physiol. 101, 9, 1910.

Diese Theorie dürfte jetzt kaum noch haltbar sein. *Nach unseren Beobachtungen kommt der Impuls, den der Hunger ausübt, nicht direkt zur Leberzelle, sondern trifft zunächst das Pankreas. Wie dieser Impuls zum Pankreas gelangt, ob auf dem Wege der Nervenbahnen oder in anderer Weise, mag dahingestellt bleiben. Das Pankreas antwortet mit der vermehrten Abgabe eines Hormons; dieses fließt zur Leberzelle, aktiviert dort die in ihr befindliche Diastase, und die Folge dieser gesteigerten Diastasetätigkeit ist die Ausschüttung des Glykogens.*

Die Arbeit ist zum Teil aus Mitteln bestritten, die wir der Hojimi-Hoshi-Stiftung verdanken.

Über die Fermente im Hühnerei.

Von

Torao Koga (Osaka, Japan).

(Aus der chemischen Abteilung des Rudolf-Virchow-Krankenhauses zu Berlin.)

(Eingegangen am 20. Juli 1923.)

Es war von vornherein anzunehmen, daß das Hühnerei verschiedene Fermente enthalten muß, die während des Brütens und in der ersten Epoche der Entwicklung für den stattfindenden Stoffwechsel Verwendung finden. In der Tat ist ein diastatisches Ferment von *Müller* und *Masuyama* (1) und *Roger* (2), ein proteolytisches, lipolytisches und chromolytisches von *Wohlgemuth* (3) im Hühnerei nachgewiesen worden.

Da anzunehmen war, daß die oben genannten Fermente ihre volle Wirkung erst während des Brütens entfalten, schien es wichtig, festzustellen, ob ihre Quantitäten in der Zeit der Bebrütung eine Änderung erfahren. Interessante Versuche in dieser Hinsicht hatte bereits *Heim* (4) mit Eiern von Kaltblütern angestellt. Er konnte nachweisen, daß die Wirksamkeit der Fermente während des Brütens zugenommen hatte. Ich habe in dieser Arbeit versucht, auf diese Frage näher einzugehen und die Fermentverhältnisse auch während des Ausbrütens beim Hühnerei zu untersuchen.

Untersuchungen über die Fermente im Eigelb.

Bei diesen Versuchen habe ich zuerst die Fermentverhältnisse in ganz frischen Hühnereiern geprüft und nachher Untersuchungen bei angebrüteten Eiern angestellt.

Diastase.

Bei der Bestimmung des Diastasegehaltes im Hühnereigelb habe ich mit wenigen Abweichungen die Methode von *Wohlgemuth* (5) benutzt.

Da natives Eigelb mit der Pipette schwer zu verteilen war, wurde zunächst eine Mischung von reinem Eigelb mit gleichen Mengen physiologischer Kochsalzlösung unter starkem Schütteln hergestellt.

Anfangs habe ich die Versuche ohne Zusatz physiologischer Kochsalzlösung mit destilliertem Wasser angestellt, dabei aber nur eine

schwache Diastasewirkung beobachtet; bei Zusatz von Kochsalz jedoch wurde die Wirkung wie bei menschlicher Diastase erheblich verstärkt. Mit dem Eigelb-Kochsalzgemisch wurde dann eine absteigende Reihe angesetzt stets unter Verdünnung mit physiologischer Kochsalzlösung und zu jedem Gläschen 5 ccm 1 prom. Stärkelösung zugesetzt. Da nur eine schwache Diastasewirkung zu erwarten war, konnte die sonst übliche 1 proz. Stärkelösung nicht verwandt werden. Es wurden meist zwei gleiche Reihen angesetzt, die eine wurde auf 2 Stunden in ein Wasserbad von 38° C gestellt, die andere auf 24 Stunden in den Brutschrank. Bei letzterer erhielten sämtliche Gläschen etwas Toluol, um den Eintritt von Fäulnis zu verhüten. Ich habe die gleichen Versuche mehrmals ausgeführt und bringe hier als Beispiel das Resultat von drei verschiedenen Eigelbportionen.

Tabelle I.

Menge des Eigelbs ccm	Eigelb I		Eigelb II		Eigelb III	
	2 Std.	24 Std.	2 Std.	24 Std.	2 Std.	24 Std.
0,5	+	+	+	+	+	+
0,25	+	+	+	+	+	+
0,125	+	+	+	+	+	+
0,062	+	+	+	+	—	+
0,031	—	+	+	+	—	+
0,016	—	+	—	+	—	+
0,008	—	+	—	+	—	+
0,004	—	+	—	+	—	—
0,002	—	—	—	—	—	—
0,001	—	—	—	—	—	—
d	$d_{2h}^{38^0} = 80$	$d_{24h}^{37^0} = 1280$	$d_{2h}^{38^0} = 160$	$d_{24h}^{37^0} = 1280$	$d_{2h}^{38^0} = 40$	$d_{24h}^{37^0} = 640$

Wie aus Tabelle I zu ersehen ist, schwankt die diastatische Kraft des Eigelbs bei zweistündiger Versuchsdauer zwischen $d_{2h}^{28^0} = 40$ bis 160, bei 24stündiger Versuchsdauer zwischen $d_{24h}^{37^0} = 640$ bis 1280. Als Mittelzahlen würden sich somit ergeben 80 bzw. 960. Ich möchte jedoch bemerken, daß bei meinen zahlreichen Untersuchungen bei zweistündiger Versuchsdauer die Zahl 80, bei 24stündiger die Zahl 1280 am häufigsten wiederkehrten.

Es war nun von Interesse, die diastatische Kraft des Hühnereigelbs zu vergleichen mit der des Blutes von verschiedenen Tieren und von Menschen. Die Werte, die *Wohlgemuth* (6) hierüber angibt, schwanken beim Menschen zwischen $d_{30'}^{38^0} = 8$ bis 32, beim Hunde $d_{30'}^{38^0} = 20$ bis 80, beim Kaninchen $d_{30'}^{38^0} = 4$ bis 32. Diese Werte lassen sich nicht ohne weiteres vergleichen mit den beim Eigelb gefundenen, da die Versuche mit Eigelb über 2 Stunden ausgedehnt wurden. Zur Not könnte man, entsprechend der viermal längeren Versuchsdauer, die beim Eigelb

gefundenen Werte durch 4 dividieren, dann ergäbe sich als Durchschnittswert für Eigelb $d_{30'}^{38^0} = 20$. Dieser Wert würde etwa dem des Menschenserums und dem des Kaninchenserums entsprechen. Um ganz sicher zu gehen, habe ich noch verschiedene Versuche mit 1 proz. Stärkelösung bei 24stündiger Versuchsdauer angestellt und folgende Resultate erhalten:

Tabelle II.

Menge des Eigelbs ccm	Eigelb IV	Eigelb V	Eigelb VI	Eigelb VII
0,5	+	+	+	+
0,25	+	+	+	+
0,125	+	+	—	—
0,062	—	—	—	—
0,032	—	—	—	—
$D_{24h}^{38^0} =$	40	40	20	20

Aus diesen Zahlen geht hervor, daß tatsächlich der Diastasegehalt des Eigelbs dem des menschlichen Serums ($D_{24h}^{37^0} = 10$ bis 80) und dem des Kaninchens ($D_{24h}^{37^0} = 10$ bis 40) entspricht.

Ich habe bereits oben darauf hingewiesen, daß die Diastase des Eigelbs in Gegenwart von Kochsalz viel besser wirkt als bei dessen Abwesenheit. Das deutete darauf hin, daß ich bei dieser Diastase ähnliche Verhältnisse bezüglich ihrer Aktivierung zu erwarten hatte wie bei der Speichel- bzw. Pankreasdiastase des Menschen. Von dieser wissen wir aus den Untersuchungen von *Wohlgemuth* (7), daß sie durch Zusatz von Serum ganz erheblich verstärkt wird. Ich prüfte nun, ob auch die Diastase des Eigelbs durch Serum in ihrer Wirkung gefördert wird. Ich ging dabei so vor, daß ich drei Reihen mit absteigenden Mengen einer Eigelbmischung ansetzte, zu der ersten als Kontrolle dienenden Reihe in jedes Gläschen 1,0 ccm Aqua dest. zufügte, zu der zweiten Reihe jedem Gläschen 1,0 ccm 1 proz. NaCl-Lösung, zu der dritten Reihe jedem Gläschen 1,0 ccm zehnfach verdünntes Serum. Um die im Serum enthaltene Diastase auszuschalten, wurde das verdünnte Serum vor dem Gebrauch 30 Minuten im Dampfbade erhitzt. Dann wurden sämtliche Gläschen mit je 5,0 ccm 1 prom. Stärkelösung beschickt und kamen auf 2 Stunden in ein Wasserbad von 38° C. Das Resultat ergibt sich aus Tabelle III.

Aus der Tabelle III geht deutlich hervor, daß das Kochsalz, vielmehr aber noch das Serum, in hohem Maße befähigt sind, die diastatische Kraft des Eigelbs zu verstärken. Man darf wohl daraus schließen, daß die Diastase des Eigelbs der des Speichels und des Pankreas des Menschen sehr nahe steht, wenn nicht gar mit ihr identisch ist. Ich hoffe, auf diesen Punkt noch an anderer Stelle zurückzukommen.

Tabelle III.

Menge des Eigelbs ccm	Eigelb I			Eigelb II		
	+ 1,0 ccm Aq. dest.	+ 1,0 ccm 1 proz. Na Cl	+ 1,0 ccm gekocht. Serum	+ 0,1 ccm Aq. dest.	+ 1,0 ccm 1 proz. Na Cl	+ 1,0 ccm gekocht. Serum
0,5	+	+	+	+	+	+
0,25	+	+	+	+	+	+
0,125	+	+	+	—	+	+
0,062	—	+	+	—	—	+
0,032	—	—	+	—	—	—
0,016	—	—	—	—	—	—
$d_{2h}^{38^0} =$	40	80	160	20	40	80

Lipase.

Das Vorkommen von Lipasen im Hühnereigelb ist zuerst von *Wohlgemuth* (3) bei der Autolyse von Eiern nachgewiesen worden.

Bei meinen Untersuchungen zur quantitativen Bestimmung des Lipasegehaltes im Eigelb habe ich zunächst Monobutyrin angewandt und gleichzeitig die Wirkung der Lipase auf das eigene im Eigelb enthaltene Fett bzw. Lecithin geprüft. Die Ausführung geschah auf folgende Weise: Ich habe vier Portionen angesetzt und zwei mit je 1,0 ccm Eigelb mit je 10,0 ccm 1 proz. Monobutyrinlösung und weitere zwei mit je 1,0 ccm Eigelb mit je 10,0 ccm destillierten Wassers. Zwei von diesen Mischungen wurden als Kontrollen benutzt und daher, um die Lipase zu vernichten, während 10 Minuten gekocht. Die vier Mischungen wurden, nachdem etwas Toluol hinzugesetzt war, fest verschlossen in den Brutschrank gebracht und dort 24 Stunden belassen. Nach Ablauf dieser Zeit wurden allen vier Gläschen einige Tropfen Phenolphthalein zugefügt und mit n/10 NaOH bis zum Auftreten der ersten bleibenden Rotfärbung titriert. Die für die Kontrollen verbrauchte NaOH-Menge, die selten den Wert von 0,1 ccm überstieg, wurde von der im Hauptversuch erforderlichen Alkalimenge abgezogen. Die so gefundenen Werte wurden auf 100,0 ccm Eigelb umgerechnet und sind nur zum Teil in Tabelle IV wiedergegeben:

Tabelle IV.

Versuchs-Nr.	Lipase (Lecithase)	Monobutyrase
1	25	70
2	40	50
3	40	60
4	55	85
5	45	65

Aus Tabelle IV ersehen wir, daß das im Eigelb enthaltene fettspaltende Ferment sowohl auf das Eifett wie auf das Eilecithin ganz

kräftig wirkt, und daß auch Monobutyrin vom Eigelb zerlegt wird. Sodann wurden Versuche mit Tributyrinlösungen nach der Vorschrift von *Rona* und *Michaelis* (8) angestellt, und zwar in der Weise, daß 1,0 bis 2,0 bis 5,0 ccm Eigelb mit je 50,0 ccm einer vorschriftsmäßig hergestellten Tributyrinlösung unter Zusatz eines Puffers gemischt wurden. Es wurde unmittelbar nach der Mischung und dann in Intervallen von 30 Minuten die Tropfenzahl mit einer einfachen Tropfpipette festgestellt, um den Fortgang der Spaltung zu beobachten. In der Mehrzahl der Fälle aber ergab sich entweder ein gänzlich negatives Resultat oder aber eine Tropfendifferenz von 3, höchstens 5 Tropfen, selbst wenn ich die Mischungen 2 Stunden und noch länger in einem Wasserbade von 38° C hielt. In einem solchen Falle mit gänzlich negativem Resultat habe ich zum Vergleich mit demselben Eigelb allein und mit 1 proz. Monobutyrinlösung in der oben beschriebenen Weise angestellt und fand für 1,0 ccm Eigelb allein eine Spaltung von 0,6 ccm n/10 NaOH und für 1,0 ccm Eigelb + 10,0 ccm 1 proz. Monobutyrinlösung eine solche von 1,1 ccm n/10 NaOH. Dieses fast refraktäre Verhalten des Eigelbs dem Tributyrin gegenüber ist um so merkwürdiger, als ich Lecithase und Monobutyrase im Eigelb niemals vermißt habe, und als im Eiweiß mitunter ganz beträchtliche Mengen an Tributyrase anzutreffen sind, wie ich unten zeigen werde.

Protease.

Das Vorhandensein von proteolytischen Fermenten im Hühnereigelb hat ebenfalls *Wohlgemuth* (3) nachgewiesen. Da aus diesen Versuchen nicht mit Sicherheit hervorgeht, ob es sich um ein trypsinähnliches oder ein erepsinähnliches Ferment handelte, habe ich versucht, diese Frage zu entscheiden.

Zuerst schritt ich zur Bestimmung des tryptischen Ferments, und zwar benutzte ich dazu die Serumplattenmethode von *Müller-Jochmann* (9). Ich habe vom Eigelb fünf Verdünnungen mit 1 proz. Kochsalzlösung hergestellt, und zwar 1 : 2, 1 : 4, 1 : 8, 1 : 16. Mit diesen Lösungen und außerdem mit unverdünntem Eigelb habe ich die Serumplatten mit einigen Tropfen versehen und sämtliche Platten bei einer Temperatur von 37° C und auch von 50° C während 24 Stunden belassen. Nach Ablauf dieser Zeit wurden die Stellen der Serumplatten, auf die die Lösungen getröpfelt worden waren, genau auf irgend eine Verdauung untersucht. Ich konnte aber niemals Veränderungen dabei feststellen, so oft ich auch die Versuche wiederholte. Auf Grund dieser Versuche möchte ich annehmen, daß das Eigelb wahrscheinlich keine tryptischen Fermente enthält.

Zur Untersuchung auf einen etwaigen Erepsingehalt des Eigelbs habe ich das Verfahren der Formoltitration von *Soerensen* (10) benutzt.

Das Eigelb habe ich mit gleichen Mengen ausgekochten (CO_2-freien) destillierten Wassers versetzt, stark geschüttelt und 10,0 ccm dieser Mischung für jeden Versuch benutzt, also 5,0 ccm Eigelb bei jedem Versuche verwandt. Für den Hauptversuch wurde den 10 ccm der eben angeführten Mischung noch 10,0 ccm einer 2proz. Wittepeptonlösung zugesetzt. Als Kontrollen habe ich zwei Lösungen benutzt: 1. 10,0 ccm Eigelbmischung mit 10,0 ccm destillierten Wassers; 2. 10,0 ccm Wittepeptonlösung + 10,0 ccm vorher gekochten destillierten Wassers. Alle diese Lösungen wurden 24 und 48 Stunden unter Zusatz von Toluol gleichfalls bei 37° C aufbewahrt. Nach Ablauf dieser Frist habe ich die Formoltitration in der üblichen Weise ausgeführt. Dabei war ich gezwungen, die Methode von *Soerensen* etwas zu modifizieren, da sich bei den Versuchen gezeigt hat, daß die Eigenfarbe des Eigelbs den roten Farbenumschlag der Lösung undeutlich macht. Ich habe die Vorversuche so ausgeführt, daß ich die Titration von drei Lösungen vorgenommen habe, und zwar: 1. 20 ccm destillierten Wassers (CO_2-freien), 2. 10 ccm 2proz. Peptonlösung + 10 ccm destillierten Wassers (Kontrollversuch 1) und 3. 10 ccm Eigelblösung + 10 ccm destillierten Wassers (Kontrollversuch 2). Bei der Titration hat sich herausgestellt, daß der Farbenumschlag in allen drei Stadien bei den ersten zwei Lösungen deutlich und in gleichem Farbenton stattgefunden hat, bei der dritten Lösung aber, in der sich Eigelb befand, war der Farbenumschlag nicht so deutlich und den ersten zwei Lösungen nicht ganz ähnlich.

Bei den Versuchen konnte ich feststellen, daß bei den ersten zwei Kontrollversuchen zur Erreichung der Farbenumschläge vom ersten bis zum dritten Stadium insgesamt höchstens 5 Tropfen einer n/5 Barytlauge notwendig waren. Von dieser Beobachtung ausgehend, habe ich bei den Lösungen mit Eigelb, nachdem ich eine schwach rotgelbliche Farbe erhalten hatte, die ich als erstes Stadium bezeichne, 5 Tropfen einer n/5 Barytlauge zugefügt und dabei eine deutlichere rote Farbe mit eigenem gelben Ton erhalten, die ich als drittes Stadium bezeichne. Bemerken will ich, daß ich bei den Vorversuchen mit destilliertem Wasser allein zur Rücktitration von 5 ccm n/5 Salzsäure 5,1 bis 5,3 n/5 Barytlauge verbraucht habe. Mithin wurden verbraucht 0,1 bis 0,3 ccm n/5 Barytlauge. Als Mittelwert mehrerer Versuche bei dem CO_2-freien Wasser allein ergab sich somit eine Menge von 0,2 ccm n/5 Barytlauge. Wie gesagt, wurden die Versuche über 24 und 48 Stunden ausgedehnt. In Tabelle V teile ich das Resultat einiger Versuche mit.

Aus diesen Versuchen geht ohne Zweifel hervor, daß das Eigelb in nicht unbeträchtlichem Maße befähigt ist, eine ereptische Wirkung auszuüben.

Bei der Berechnung folgender Werte habe ich natürlich die bei den Kontrollen verbrauchten Barytlaugen stets in Abzug gebracht.

Tabelle V.

Aus Pepton abgespaltener N in Milligramm pro 100 ccm Eigelb.

Versuchs-Nr.	Nach 24 Std.	Nach 48 Std.
1	0	103,6
2	84,0	156,8
3	78,4	156,7
4	89,6	168,0
5	78,4	154,0

Wie oben bereits angegeben, habe ich auch Eigelblösung allein ohne Zusatz von Pepton, nur mit der entsprechenden Menge Wasser im Brutschrank unter Toluol aufbewahrt und zu gleicher Zeit wie die Hauptprobe mit n/5 Barytlauge titriert. Dabei konnte ich jedesmal feststellen, daß nach 24stündigem Stehen im Brutschrank die Menge der zur Neutralisation erforderlichen Barytlauge zunahm und mit weiterer Ausdehnung des Versuches größer wurde. Diese Beobachtung erklärt sich ganz einfach daraus, daß im Eigelb, wie ja schon *Wohlgemuth* gefunden hat, autolytische Vorgänge sich abspielen, und die Menge der verbrauchten Barytlauge ist nichts anderes als der Ausdruck dieser Autolyse. Wenn ich aus meinen derartigen zahlreichen Versuchen den Durchschnittswert berechne, so ergibt sich für 100 ccm natives Eigelb nach 24 Stunden eine Abspaltung von 67,2 mg Stickstoff, nach 48 Stunden eine solche von 75,6 mg.

Salicylase.

Ich habe ebenfalls Versuche angestellt, um Salicylase im Eigelb festzustellen. Für diese Untersuchungen benutzte ich die Methode von *Salkowski* (11) zum Nachweis von Salicylase.

Hierzu wurden 5,0 ccm Eigelb mit 10,0 ccm destillierten Wassers vermengt, dann wurden 1,0 ccm Salicylaldehyd und etwas Toluol zugefügt, und das ganze Gemisch wurde 24 bis 48 Stunden bei 37° im Brutschrank aufbewahrt. Nach Ablauf dieser Zeit wurde die Lösung mit 30 ccm destillierten Wassers verdünnt, dazu wurden zwecks Entfernung der Eiweiß- und Fettsubstanzen tropfenweise 35 ccm fünffach verdünnter kolloidaler Eisenlösung unter starkem Schütteln hinzugefügt und zuletzt noch 1 ccm 0,5proz. Magnesiumsulfatlösung. Nach einigem Stehen wurde filtriert und das klare farblose Filtrat auf dem Wasserbade zum dicken Sirup eingeengt. Der Rückstand wurde mit 96proz. Alkohol extrahiert und der Extrakt abfiltriert. Danach wurde der Alkohol auf dem Wasserbade vollständig verjagt, der Rückstand in Wasser aufgenommen, mit Schwefelsäure angesäuert und das saure Gemisch mehrmals mit Äther im Scheidetrichter ausgeschüttelt. Der Ätherextrakt wurde vorsichtig vom Wasser getrennt, vereinigt durch ein Filter geschickt und abdestilliert. Der nunmehr bleibende Rückstand

wurde mit verdünnter Eisenchloridlösung auf die Gegenwart von Salicylsäure geprüft. Dabei trat in allen von mir untersuchten Fällen eine schöne violette Färbung auf. Wir können somit sagen, daß im Eigelb eine Salicylase vorhanden ist.

Histozym.

Dieses Ferment ist weit verbreitet. Man hat es in verschiedenen tierischen Organen gefunden und auch in Pilzen und Bakterien getroffen. Es besitzt die Fähigkeit, die Hippursäure in Glykokoll und Benzoesäure zu zerlegen. Ich habe nun untersucht, ob auch im Hühnerei dieses Ferment sich vorfindet, und habe zunächst mit Eigelb Versuche angestellt.

Ich ging dabei so vor, daß ich 10,0 ccm Eigelb mit 0,4 g hippursaurem Natrium versetzte, die ich zuvor in 20,0 ccm Wasser gelöst hatte. Das Gemisch wurde gut durchgeschüttelt, mit reichlichem Toluol versetzt zur Verhütung von Fäulnis und dann in den Brutschrank auf 5 Tage gebracht. Nach Ablauf der Frist wurde mit kolloidalem Eisen enteiweißt und das wasserklare Filtrat auf dem Wasserbade bis auf 20,0 ccm eingeengt. Dann wurde mit verdünnter Salzsäure gegen Kongopapier schwach angesäuert und die Flüssigkeit viermal mit je 20,0 ccm Petroläther im Scheidetrichter ausgeschüttelt. Die vereinigten Petrolätherextrakte wurden mittels Durchleitens eines trockenen Luftstromes vom Petroläther befreit und der am Boden des Gefäßes zurückbleibende Kristallbrei noch einmal aus Petroläther umkristallisiert.

Die schneeweißen nadelförmigen Kristalle zeigten den für Benzoesäure typischen Schmelzpunkt von 120° C.

So konnte ich in jedem von mir untersuchten Eigelb die Gegenwart von Histozym mit Sicherheit nachweisen.

Die Versuche, die ich gleichzeitig mit Eiereiweiß anstellte, ergaben nicht immer positives Resultat.

Verhalten der Fermente des Eigelbs bei der Bebrütung.

Für die Versuche verwandte ich befruchtete Eier, die ich unter allen Kautelen im Brutschrank der Körperwärme aussetzte. Nach siebentägiger Bebrütung konnte ich mittels Durchleuchtung die Gegenwart eines Embryos in allen Eiern feststellen. Hiermit untersuchte ich das Eigelb von einigen, 7 Tage lang bebrüteten Eiern auf Diastase, Lipase, Protease, Salicylase und auch Katalase.

Die Untersuchung der letztgenannten Fermente schien mir deshalb besonders interessant, weil, vom Embryo ausgehend, das Eigelb umsponnen war von einem Netze feinster Blutgefäße, und weil man annehmen durfte, daß sich vielleicht jetzt Katalase im Eigelb nachweisen lassen würde. Frühere Versuche von mir, in unbebrüteten Eiern Kata-

lase festzustellen, hatten stets ein negatives Ergebnis. Ich trennte zu dem Zwecke sehr vorsichtig das Eigelb von dem Embryo, ohne irgend ein Blutgefäß zu verletzen, und untersuchte es in der üblichen Weise unter Verwendung von 1 proz. Wasserstoffsuperoxydlösung auf die Gegenwart von Katalase. Aber auch hier war in jedem Falle das Resultat ein durchaus negatives und blieb es auch die ganze Zeit, soweit auch die Entwicklung des Embryos und seiner Gefäße fortschritt. Ebenso negativ fielen die Untersuchungen auf Trypsin und Salicylase aus.

Dagegen ergab sich für die Diastase mit weiteren Fortschritten der Entwicklung eine deutliche Zunahme. Die Werte für die Lipase bewegten sich während der ganzen Brutzeit in fast denselben Grenzen, wie wir sie bei den unbebrüteten Eiern beobachtet haben.

Für beide Fermente teile ich das Resultat der Untersuchungen in Tabelle VI mit.

Tabelle VI.

Bruttage:	7.	8.	9.	10.	11.	12.
Gesamte Eigelbmenge . . . . g	21	17	22	20	8	4
Diastase $d_{2\,h}^{38^0}$	80	80	80	320	320	320
Diastase $d_{24\,h}^{37^0}$	1280	640	640	2560	1280	2560
Monobutyrase ccm n/10 NaOH für 100,0 Eigelb	30,0	50,0	25,0	60,0	75,0	60,0
Lipase (Lecithase) ccm n/10 NaOH für 100,0 Eigelb . .	30,0	30,0	25,0	20,0	20,0	30,0

Im großen und ganzen sehen wir also, daß während der Bebrütung unter den Fermenten des Eigelbs keine großen Umwälzungen stattfinden; nur die Diastase nimmt an Wirkung zu und Salicylase verschwindet.

Untersuchungen über die Fermente im frischen Hühnereiweiß.

Diastase.

Bei der Untersuchung des Hühnereiweißes auf Diastase ging ich in der gleichen Weise vor, wie bei der Untersuchung des Eigelbs angegeben wurde. Da die Verteilung reinen Eiweißes mittels Pipette nicht gut durchführbar war, wurde zunächst Eiweiß mit physiologischer Kochsalzlösung zu gleichen Teilen gemischt und mit diesem Gemisch eine absteigende Reihe angestellt. Als Stärkelösung verwandte ich, da nur eine sehr schwache Diastasewirkung zu erwarten war, auch eine 1 promillige und setzte davon zu jedem Gläschen 5,0 ccm zu. Die Reihe kam dann auf 3 bzw. 4 Stunden und auf 24 Stunden ins Wasserbad bzw. in den Brutschrank. Die so gefundenen Werte sind wesentlich niedriger als die mit Eigelb ermittelten. Sie schwanken im wesentlichen zwischen $d_{24\,h}^{38'} = 20$ bis 80. Die Diastase im Eiweiß

ist so gering, daß bei zweistündiger Versuchsdauer unter obiger Versuchsanordnung das Resultat überhaupt ein negatives war. Erst bei drei- und vierstündigem Verweilen der Versuchsreihen im Wasserbade konnte ich ganz minimale Wirkungen erzielen. Im Vergleich zu den Diastasemengen im Eigelb würde sich ergeben, daß das Eigelb 32mal soviel Diastase enthält als das Hühnereiweiß.

Lipase.

Zur Prüfung auf die Gegenwart von Lipase im Eiweiß verwandte ich die stalagmometrische Methode von *Rona* und *Michaelis* (12).

Zu dem Zwecke stellte ich mir eine wässerige Tributyrinlösung in der Weise her, daß ich 2 Tropfen Tributyrin mit 200 ccm Wasser stark und längere Zeit schüttelte und dann durch ein feuchtes Filter filtrierte. Den Versuch setzte ich dann so an, daß ich 5,0 ccm frisches Eiweiß mit 50,0 ccm Tributyrinlösung und 1,0 ccm Phosphatgemisch versetzte und sofort die Tropfenzahl bei 18° C feststellte. Als Kontrollen dienten zwei Gemische: a) 5,0 ccm Eiweiß + 50,0 ccm Wasser + 1,0 ccm Phosphatgemisch, b) 5,0 ccm Wasser + 50,0 ccm Tributyrinlösung + 1,0 ccm Phosphatgemisch. In diesen beiden Kontrollen wurde gleichfalls sofort die Tropfenzahl bestimmt. Sämtliche drei Portionen kamen dann zu gleicher Zeit in ein Wasserbad von 38° C und blieben dort zunächst 30 Minuten. Danach wurden sie wieder auf 18° C abgekühlt, die Tropfenzahl bestimmt und abermals in das Wasserbad gebracht. In der gleichen Weise wurde nach 60 und nach 90 Minuten der Versuch unterbrochen und der Fortgang der Spaltung ermittelt. Auf diese Weise untersuchte ich eine große Zahl von Eiern und konnte in allen feststellen, daß das Eiweiß in viel größeren Mengen die Fähigkeit besitzt, Tributyrin zu spalten als das Eigelb. In Tabelle VII stelle ich das Resultat von nur fünf Versuchen zusammen, die von mir untersuchte Zahl ist eine weit größere.

Tabelle VII.

Versuchs-Nr.	Tropfenzahl				Abnahme der Tropfen
	sofort	nach 30 Min.	nach 60 Min.	nach 90 Min.	
1	118	91	91	89	20
2	124	118	113	110	14
3	123	116	112	108	15
4	102	102	101	100	2
5	125	123	120	119	6

Vergleichen wir die in Tabelle VII mitgeteilten Zahlen für die Tropfendifferenz mit denen bei der Einwirkung von Eigelb auf Tributyrin festgestellten, so ergeben sich ganz beträchtliche Unterschiede. Während ich hier durchschnittlich eine Abnahme von 14 bis 15 Tropfen

zu verzeichnen habe, ist die Mittelzahl für Eigelb 3 bis 4. Ich möchte jedoch nicht versäumen, darauf hinzuweisen, daß ich mitunter auch im Eiweiß ein fast gänzlich negatives Resultat bei der Tributyrinspaltung zu verzeichnen hatte, unter mehr als zehn Fällen begegnete ich im ganzen 2 bis 3 Fällen von fast negativem Resultat.

Zur Technik der Versuchsanordnung möchte ich bemerken, daß es in meinen Versuchen ganz ohne Belang war, ob ich mit oder ohne Phosphatgemisch arbeitete. In mehrfachen Kontrollen konnte ich mich davon überzeugen, daß die Spaltung ohne Phosphatgemisch ebensogut verlief wie mit Zusatz eines Puffers. Diese Feststellung machte ich erst gegen Ende meiner Versuche; bei der Mehrzahl der von mir mitgeteilten Versuche war noch ein Puffer verwandt worden.

Neuerdings haben nun *Rona und seine Mitarbeiter* (13) darauf hingewiesen, daß manche Lipase sich gegenüber Chinin und Atoxyl je nach ihrer Herkunft ganz verschieden verhalten. So ist nach ihren Untersuchungen die Serumlipase und Pankreaslipase stark chininempfindlich, Leberlipase dagegen ganz unempfindlich gegen Chinin, während sie durch Atoxyl in ihrer Wirkung stark beeinträchtigt wird. In Anlehnung an diese Beobachtung prüfte ich das Verhalten der Lipase im Eiweiß gegenüber Chinin und Atoxyl. Ich ging dabei in der Weise vor, daß ich zu dem Gemisch von 5,0 ccm Eiweiß + 50,0 ccm Tributyrinlösung + 1,0 ccm Phosphatgemisch, Chinin in Mengen von 5 bis 10 mg zusetzte. Gleichzeitig wurde natürlich die entsprechende Kontrolle angesetzt. Dabei beobachtete ich, daß bei Gegenwart von 5 mg die Beeinflussung nur eine mäßige war. Dagegen hemmten 10 mg Chinin in jedem Falle die Lipase sehr stark. Atoxyl aber zeigte sowohl bei 5 wie bei 10 mg nicht den geringsten Einfluß auf die Lipase. Als Beleg führe ich hier für beide Versuchsreihen je einen Versuch an (Tab. VIII).

Die Empfindlichkeit gegenüber dem Chinin und die Unempfindlichkeit gegenüber dem Atoxyl ist auch charakteristisch für die Pankreaslipase und die Darmlipase, und man könnte versucht sein, hieraus nahe Verwandtschaft zwischen Eiereiweißlipase und Pankreas- bzw. Darmlipase herzuleiten. Solange aber noch nicht festgestellt ist, daß sie auch noch in anderer Beziehung übereinstimmen, wäre eine solche Annahme verfrüht.

Gleichzeitig habe ich auch das Verhalten des Eiereiweißes gegenüber dem Monobutyrin geprüft und bin dabei in der üblichen Weise vorgegangen, indem ich 1,0 bis 2,0 bis 5,0 ccm Eiereiweiß mit 10,0 ccm einer 1proz. Monobutyrinlösung mischte und auf 24 Stunden in den Brutschrank stellte. Nach Ablauf der Frist wurde die in Freiheit gesetzte Säure mit n/10 NaOH gegen Phenolphthalein als Indikator titriert. Dabei ergab sich, auf 100 ccm Eiereiweiß berechnet, ein Durchschnittswert von 15 ccm n/10 NaOH. Dieser Wert bleibt weit zurück hinter dem entsprechend für Eigelb festgestellten.

Tabelle VIII.

Versuchs-Nr.	Ohne Chinin				Mit Chinin							
					5 mg				10 mg			
	0'	30'	60'	90'	0'	30'	60'	90'	0'	30'	60'	90'
1	124	121	119	117	127	126	124	123	—	—	—	—
2	120	113	109	100	—	—	—	—	126	124	122	119

Versuchs-Nr.	Ohne Atoxyl				Mit Atoxyl							
					5 mg				10 mg			
	0'	30'	60'	90'	0'	30'	60'	90'	0'	30'	60'	90'
1	120	113	109	100	120	115	110	101	—	—	—	—
2	124	121	119	117	—	—	—	—	123	120	117	115

Protease.

Schon *Wohlgemuth* (3) hat Versuche gemacht, um proteolytische Fermente im Eiweiß festzustellen, aber diese Versuche, die mit der Autolyse ausgeführt wurden, haben nur negative Resultate ergeben.

Es wurde deshalb versucht, mit einer anderen Methodik diese Frage zu entscheiden. Analog den Versuchen mit Eigelb habe ich erst mit Hilfe der Formoltitrationsmethode mich bemüht, eine ereptische Wirkung festzustellen, erhielt hierbei jedoch stets negative Resultate. Dann wurde untersucht, ob Eiereiweiß eine Karminfibrinflocke anzugreifen vermag. Es zeigte sich tatsächlich, daß das Eiweiß imstande ist, geringe Mengen der Fibrinflocke zu lösen. Um die Wirkung quantitativ zu messen und um auf diese Weise verschiedene Eier miteinander zu vergleichen, wurde eine Reihe mit absteigenden Mengen Eiereiweiß angesetzt und zu jedem Gläschen eine kleine — etwa hirsekorngroße — Flocke zugesetzt. Gleichzeitig wurde eine Kontrolle mit gekochter Eiweißlösung angestellt. Ich ging bei meinen Versuchen, da natives Eiweiß beim Erhitzen sofort zu einer kompakten Masse erstarrt, stets von einer fünffachen Verdünnung aus, indem ich zur Verdünnung destilliertes Wasser verwandte. Mit einem Teil dieser Verdünnung setzte ich sofort eine Reihe an; der andere Teil wurde vorher 30 Minuten in siedendem Wasserbade erhitzt und nach der Abkühlung in der gleichen Weise zum Versuche verwandt. Beide Reihen kamen dann in ein Wasserbad von 38° C, und nach Ablauf einer Stunde wurde das Resultat notiert, ebenso nach zweistündigem und nach 24stündigem Aufenthalt im Brutschrank. Das Resultat eines solchen Versuches teile ich in Tabelle IX mit, wobei (+) deutliche Rotfärbung, (sp) nur spurweise Rotfärbung bedeutet.

Wie aus Tabelle IX ersichtlich ist, zeigen die ersten drei Reagenzgläschen des Hauptversuches nach Ablauf eines einstündigen Ver-

Tabelle IX.

Wirkliche Eiweißmenge ccm	Hauptversuch			Kontrollversuch		
	nach 1 Std.	nach 2 Std.	nach 24 Std.	nach 1 Std.	nach 2 Std.	nach 24 Std.
1,0	+	+	++	—	sp	+
0,5	+	+	++	—	sp	+
0,25	+	+	++	—	sp	—
0,1	—	—	+	—	—	—
0,05	—	—	+	—	—	—
0,025	—	—	—	—	—	—
0,0125	—	—	—	—	—	—

weilens im Wasserbade eine Rotfärbung, dagegen keine im Kontrollversuch. Nach zweistündiger Aufbewahrungszeit beobachtet man ebenfalls eine Rotfärbung des Hauptversuches, beim gleichen Kontrollversuch aber nur eine Andeutung davon. Nach 24 Stunden ist die Rotfärbung beim Hauptversuch in den ersten drei Gläschen besonders deutlich zu sehen, außerdem weisen noch zwei andere weitere Gläschen eine Rötung auf. Bei dem gleichen Kontrollversuch weisen aber nur drei Gläschen eine etwas deutliche Rotfärbung auf. In keinem der Gläschen mit Rotfärbung habe ich jemals eine völlige Auflösung der Fibrinflocke beobachtet. Ich konnte immer nur eine leichte Auffaserung oder auch mitunter nur eine Lockerung des peripheren Teiles der Flocke feststellen. Immerhin möchte ich das doch als den Ausdruck einer Fibrinolyse auffassen. In sechs solchen von mir angestellten Versuchen haben vier sicher positive Resultate ergeben. Ich möchte hieraus schließen, daß im Eiereiweiß auch ein fibrinolytisches Ferment, wenn auch nur ein sehr schwaches, enthalten ist.

Daß auch bei den Kontrollen trotz der vorausgegangenen starken Erhitzung eine geringe positive Reaktion beobachtet wurde, könnte vielleicht so erklärt werden, daß trotz Erhitzens ein geringer Teil der fibrinolytischen Kraft erhalten geblieben war infolge der Schutzwirkung, die das Eiereiweiß auf das Ferment ausübt. Denn es ist ja bekannt, daß Fermentlösungen in ihrer Wirkung durch Erhitzen viel weniger geschwächt werden, wenn man diesen Eingriff in Gegenwart des Substrats vornimmt, auf welches das Ferment wirkt oder zu dem es in irgend einer Beziehung steht, als wenn man reine Fermentlösungen allein erhitzt.

Oxydasen.

Im Hinblick darauf, daß in der Mehrzahl der Fälle das aus der Schale kriechende Hühnchen ein stark pigmentiertes Federkleid zeigt, schien es nicht aussichtslos, das Eiereiweiß auf die Gegenwart eines Ferments zu untersuchen, welches für die Pigmentierung verantwortlich sein mußte. Denn wie sollte man sich anders als durch ein Ferment die massenhaften Pigmentierungen entstanden denken, die

beispielsweise in den Federn eines braunen oder schwarzen Hühnchens abgelagert sind. Wenn das wirklich der Fall war, so mußte sich auch im Eiereiweiß dieses Ferment entweder präformiert finden oder während der Bebrütung plötzlich in die Erscheinung treten.

Ich untersuchte deshalb das Hühnereiweiß von unbebrüteten Eiern auf sein Verhalten gegenüber Brenzkatechin, Adrenalin und Tyrosin, um zu ermitteln, ob es imstande ist, aus diesen Produkten melaninartige Substanzen zu bilden. Ich verfuhr so, daß ich frisches Hühnereiweiß mit geringer Menge von Brenzcatechin in wässeriger Lösung, von salzsaurem Suprarenin und von Tyrosin, gleichfalls in Wasser gelöst, versetzte. Gleichzeitig stellte ich Kontrollen an mit gekochtem Hühnereiweiß und den entsprechenden Zusätzen und brachte alle Gläschen in einen Brutschrank. Dabei zeigte sich, daß die Portion mit Brenzcatechin sich schon nach einigen Stunden hellbraun färbte und nach 24 Stunden eine tief dunkelbraune Farbe angenommen hatte, während die Kontrolle nur eine ganz schwach hellbraune Färbung zeigte. In der Portion mit Adrenalin beobachtet man erst nach Verlauf von 24 Stunden eine bräunliche Farbe, während die Kontrolle sich gar nicht verändert hatte, und nach 48 Stunden ein viel tieferes Braun als am Tage vorher. In der Tyrosinportion zeigte sich gar keine Veränderung, auch wenn die Versuche über 3 und 4 Tage ausgedehnt wurden. Stets sah ich, daß in den positiven Gläschen die Farbstoffbildung zunächst an der Oberfläche begann und von dort aus weiter in die Tiefe ging. Sämtliche Versuche wurden, um einer Störung durch Fäulnis zu begegnen, stets unter Toluol gehalten.

Diese Versuche habe ich zu wiederholten Malen ausgeführt und bin stets beim Brenzcatechin und beim Adrenalin zu einem positiven, beim Tyrosin zu einem negativen Resultat gekommen.

In einem Falle hatte ich auch Gelegenheit, einen Versuch mit Dioxyphenylalanin, das unter dem Namen Dopareagens bekannt ist, auszuführen. Hier konnte ich schon nach Verlauf von 15 Minuten eine deutliche Hellbraunfärbung konstatieren, die von Stunde zu Stunde tiefer wurde und am nächsten Tage fast schwarz war.

Aus diesem Befunde glaube ich mit Sicherheit schließen zu dürfen, daß sich im Eiereiweiß eine Oxydase befindet, die Brenzcatechin, Adrenalin und Dioxyphenylalanin anzugreifen vermag, nicht dagegen Tyrosin. Wir habe es hier mit einem ähnlichen Ferment zu tun, wie es *Neuberg* (14) in einem Tumor der menschlichen Nebenniere nachweisen konnte, das wohl Adrenalin, aber nicht Tyrosin zu oxydieren imstande war. Das von ihm in Sepia officinalis aufgefundene Ferment oxydierte Adrenalin, Tryptophan und Brenzcatechin und in geringem Maße Tyrosin unter Farbstoffbildung. Da ich niemals einen Abbau von Tyrosin in meinen Versuchen beobachtete, möchte ich annehmen, daß das

Ferment im Hühnereiweiß von dem in Sepia officinalis verschieden ist. In meinem Falle habe ich es mit einem Ferment zu tun, dessen Wirkung nur gegen Phenolderivate mit zwei Oxygruppen gerichtet ist. Allerdings hatte ich außer dem Tyrosin kein anderes Benzolderivat mit einer Hydroxylgruppe zu meinen Versuchen zur Verfügung, und ich möchte deshalb meine Auffassung von der besonderen Affinität meines Ferments zu den doppelt hydroxylierten Benzolderivaten nur mit aller Reserve vertreten.

Nachdem es mir gelungen war, im Hühnereiweiß ein Ferment aufzufinden, das aus intermediären Stoffwechselprodukten melaninartige Substanzen zu bilden vermag, lag es nahe, an die Frage heranzutreten, ob im Hühnereiweiß sich neben dem Ferment noch gleichzeitig auch das Substrat präformiert findet, auf welches das Ferment wirkt. Natürlich erwartete ich nicht, etwa im Hühnereiweiß Substanzen wie Brenzcatechin, Adrenalin und Dioxyphenylalanin frei anzutreffen. Aber man konnte doch daran denken, daß sich die Muttersubstanzen für das Pigment des Hühnchens in irgend einer Form im Ei finden, bei der man sie unter Verwendung einer kräftigen Fermentlösung (Adrenalase bzw. Tyrosinase) vielleicht erkennen konnte. Für die Herstellung der Fermentlösung dienten mir getrocknete Pilze, und zwar Russula delica, die mir Herr Prof. *Wohlgemuth* in liebenswürdiger Weise zur Verfügung stellte. Das Material war bereits 13 Jahre alt und diente seinerzeit Herrn Prof. *Wohlgemuth* (15) bei seinem Studium über Melanosarkom. Mit Hilfe dieses Pilzes war es ihm gelungen, aus einem weißen Sarkom ein Melanosarkom im Reagenzglase darzustellen.

Ich stellte mir aus dem Material einen Extrakt in der Weise her, daß ich die getrockneten Pilze in der Reibschale zu einem Pulver zerrieb und dann mit destilliertem Wasser extrahierte. Der so gewonnene Extrakt war imstande, schon im Verlauf von einer Stunde Adrenalin in schwacher Lösung und ebenso gelöstes Tyrosin hellbraun bzw. dunkelbraun und letzteres schon nach 3 Stunden schwarz zu färben. Mit dieser Pilzart haben *Abderhalden* und *Guggenheim* (16) ihre Untersuchungen an verschiedenen Aminosäuren, insbesondere an Tyrosin und an zahlreichen l-Tyrosin enthaltenden Polypeptiden angestellt und gefunden, daß sie alle durch das in Russula delica enthaltene Ferment dunkel gefärbt werden. Gerade im Hinblick auf dieses Verhalten der Polypeptide schien es mir aussichtsvoll, auf das Eiereiweiß und auf das Eigelb die Fermentlösung einwirken zu lassen. Die Versuche wurden so ausgeführt, daß zu 3 ccm Eiereiweiß bzw. 3 ccm Eigelb je 1 ccm der stark wirksamen Fermentlösung zugesetzt wurde und die Gläschen in ein Wasserbad von 38° C gestellt wurden. Dabei zeigte sich in keinem Falle im Eiereiweiß jemals eine Farbenänderung: die Lösungen zeigten noch nach 24 Stunden dieselbe Farbe wie zu Beginn des Versuches. Bei Eigelb dagegen war mitunter eine leichte

Farbenänderung zu konstatieren, und es hatten sich am Boden des Reagenzglases einzelne dunkle Partikelchen angesammelt. Es scheint also, als ob im Eigelb eine Substanz vorhanden ist, die vielleicht als die Muttersubstanz für das Pigment des Hühnchens zu gelten hat.

Verhalten der Fermente des Eiereiweißes während der Bebrütung.

Was zunächst die Diastase anbetrifft, so konnte ich im Eiweiß von Eiern, die 8 bis 12 Tage der Brutschrankwärme ausgesetzt waren, und in denen sich der Embryo gut entwickelt hatte, eine deutliche Zunahme konstatieren.

Während sich im unbebrüteten Eiereiweiß die Diastasen bewegen zwischen $d_{24\,\mathrm{h}}^{38^0} = 20$ bis 80, im Durchschnitt also $d_{24\,\mathrm{h}}^{38^0} = 40$ betragen, zeigte das bebrütete Eiweiß Werte von $d_{24\,\mathrm{h}}^{38^0} = 80$ bis 160. Dasselbe Verhalten hatte auch die Eigelbdiastase gezeigt, über die bereits oben berichtet wurde.

Im Gegensatz dazu fand ich für die Lipase stets kleinere Werte nach der Bebrütung als im unbebrüteten Eiereiweiß, und zwar betrug die Abnahme fast ein Drittel der normalen Werte; während normaliter die Tropfenzahlen im Mittel 14 bis 15 betrugen, ergab sich in bebrütetem Eiereiweiß ein Mittelwert von 5 bis 6 Tropfen.

Desgleichen ergab die Prüfung auf Oxydasen im bebrüteten Hühnereieiweiß eine Abnahme desselben. So wurde z. B. Brenzcatechin viel langsamer und schwächer oxydiert als vom normalen Eiereiweiß. Dasselbe konnte ich für Adrenalin und für Dioxyphenylalanin konstatieren. Im Anschluß hieran stellte ich noch einmal Versuche mit dem oben beschriebenen Pilzextrakt aus Russula delica an in der Erwartung, daß durch die Vorgänge bei der Bebrütung vielleicht irgendwelche Abspaltungen oder Zerlegungen des Eiereiweißes eingetreten waren, und daß nunmehr die Fermentlösung ein günstiges Angriffsobjekt finden würde. Indessen waren auch jetzt alle Versuche negativ; es zeigte sich bei Zusatz von stark wirksamem Pilzextrakt zu dem bebrüteten Eiereiweiß in allen Versuchen keinerlei Dunkelfärbung. Mehr von Erfolg begünstigt waren wir dagegen bei den Versuchen mit bebrütetem Eiereigelb. Während beim unbebrüteten Eiereigelb sich unter dem Einfluß von dem Pilzextrakt nur äußerst schwache Dunkelfärbung konstatieren ließ, ergaben die Versuche mit dem bebrüteten Produkt ganz deutliche Dunkelfärbung, ja in einem Falle konnte ich sogar kleine schwarze Partikelchen in dem Eigelbfermentgemisch beobachten. Ich möchte diesen interessanten Befund so erklären, daß während der Bebrütung sich aus dem im Eigelb befindlichen Protein irgendwelche Komplexe von vielleicht peptidartigem Bau ähnlich den von *Abderhalden* und *Guggenheim* untersuchten losgelöst und so das Material für den Fermentangriff geliefert haben.

Zusammenfassend haben meine Untersuchungen folgendes ergeben:

1. Das Eigelb ist weit reicher an Diastase als das Eiweiß; die daselbst vorhandenen Quantitäten entsprechen etwa dem Gehalt des Menschen- und Kaninchenserums an Diastase. Während der Bebrütung des Eies nimmt mit fortschreitender Entwicklung des Embryos die Diastase im Eigelb zu, und ebenso zeigt auch das Eiereiweiß eine verstärkte diastatische Kraft bei der Bebrütung. Die Diastase des Hühnereies verhält sich wie die Diastase beim Menschen, sie wird durch die Gegenwart von Kochsalz, noch mehr aber durch Serum stark aktiviert.

2. Monobutyrase findet sich im Eigelb in beträchtlicher Menge, viel weniger dagegen im Eiereiweiß. Im Gegensatz dazu ist Tributyrase im Eiereiweiß in weit größerer Menge enthalten als im Eigelb. Sie ist wie die Pankreas- und die Darmlipase empfindlich gegen Chinin, unempfindlich gegen Atoxyl. Während der Bebrütung nimmt sie an Menge erheblich ab. Die Monobutyrase dagegen zeigt während der Bebrütung keine Abschwächung in ihrer Wirkung.

3. Von eiweißspaltenden Fermenten wurde neben dem bereits bekannten autolytischen auch ein ereptisches gefunden und im Eiereiweiß ein fibrinolytisches, das aber nur sehr schwache Wirkung zeigte.

4. Im Eigelb finden sich Salicylase und Histozym; beide verschwinden während der Bebrütung.

5. Im Eiereiweiß konnte eine Oxydase nachgewiesen werden, die befähigt ist, aus Brenzcatechin, Adrenalin und Dioxyphenylalanin einen braunen Farbstoff zu bilden. Tyrosin wurde von dem Ferment nicht angegriffen. Während der Bebrütung nimmt die Wirkung dieses Ferments ab. — Im frischen Eigelb, besonders aber im bebrüteten, findet sich eine Substanz, welche durch die Oxydase von Russula delica hellbraun bis schwarz gefärbt wird.

Die Arbeit ist zum Teil aus Mitteln bestritten, die wir der Hojimi-Hoshi-Stiftung verdanken.

Literatur.

1) *Müller* und *Masuyama*, Zeitschr. f. Biol. **39**, 5417, 1900. — 2) *Roger*, Journ. de physiol. et pathol. gen. 1908, S. 797. — 3) *J. Wohlgemuth*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **44**, 540, 1905. — 4) *Heim*, Soc. biol. **44**, 467, 1892. — 5) *Wohlgemuth*, diese Zeitschr. **9**, 1, 1908. — 6) *Derselbe*, „Grundriß der Fermentmethoden", S. 57, 1913. — 7) *Derselbe*, diese Zeitschr. **33**, 303, 1911. — 8) *Rona* und *Michaelis*, ebendaselbst **31**, 345, 1911. — 9) *Müller-Jochmann*, Münch. med. Wochenschr. Heft 29, 1906. — 10) *Soerensen*, diese Zeitschr. **7**, 45, 1908. — 11) *Salkowski*, Virchows Archiv **147**, 1898. — 12) *Rona* und *Michaelis*, l. c., S. 9. — 13) *Rona*, *Petow* und *Schreiber*, Klin. Wochenschr. **48**, 2366, 1922. — 14) *Neuberg*, Virchows Archiv **192**, 514, 1908; diese Zeitschr. **8**, 383, 1908; Zeitschr. f. Krebsforsch. **8**, 195, 1910. — 15) *Wohlgemuth*, Berl. klin. Wochenschr. 1910. — 16) *Abderhalden* und *Guggenheim*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **54**, 331, 1908.

Über die Einwirkung von Metallsalzen auf den Verlauf der alkoholischen Gärung.

Von

Albert v. May.

(Aus dem Kaiser Wilhelm-Institut für experimentelle Therapie und Biochemie in Berlin-Dahlem.)

(Eingegangen am 21. Juli 1923.)

Künstliche Eingriffe in die Kette der Umsetzungen, die bei alkoholischer Zuckerspaltung ablaufen, haben es ermöglicht, Einblicke in den verwickelten Mechanismus der sich hier abspielenden Vorgänge zu tun. Nach dieser Richtung haben wesentliche Erfolge die verschiedenen *Abfangverfahren* gezeitigt; die Abfangmittel bedingen qualitativ wie quantitativ bedeutende Abartungen. Jede Methode, welche auf irgendwelchen Wegen eine Verschiebung im Getriebe der normalen Reaktionsfolgen herbeiführt und eine durchsichtige Erfassung abnormer Gärprodukte ermöglicht, verdient die größte Beachtung; denn man kann hoffen, mit ihrer Hilfe entweder neue Zwischenstufen des Zuckerzerfalls aufzufinden oder eine vertiefte Einsicht in die Natur der schon bekannten Umwandlungen zu gewinnen.

Von diesen Gesichtspunkten aus schien mir eine nähere Untersuchung einer von *S. Kostytschew*[1]) gemachten Mitteilung aussichtsvoll, laut der Salze der beiden nahe verwandten Metalle Zink und Cadmium eine besondere Wirkung bei der geistigen Gärung ausüben. Sie soll darin bestehen, daß Acetaldehyd in vermehrter Menge auftritt und ein beträchtlicher Teil des Kohlenhydrats verschwindet, ohne in Alkohol und Kohlendioxyd oder in andere bekannte Stoffe überzugehen. Frühere Nachprüfungen dieser Angaben, die sich damals nur auf die Zinksalze

---

[1]) *S. Kostytschew*, H. 79, 130, 1912; 111, 126 und 132, 1920.

erstreckt hatten, sind durch *C. Neuberg* und *Joh. Kerb*[1]) sowie von *E. Buchner*, *K. Langheld* und *S. Skraup*[2]) erfolgt. Alle diese Autoren waren zu keiner Bestätigung der *Kostytschew*schen Auffassung gelangt. *Neuberg* und *Kerb* haben besonders darauf aufmerksam gemacht, daß die Menge von Acetaldehyd, die bei dem Vorgehen *Kostytschews* und nach seinen eigenen Angaben erzielt worden war, äußerst spärlich ist und sich im Maximum auf **0,15** Proz. des verwendeten Zuckers belief. Diese Zahl muß um so geringfügiger erscheinen, wenn man bedenkt, daß z. B. das *Sulfitabfangverfahren* glatt **75 bis 80** Proz. der theoretisch möglichen Menge an Gärungsacetaldehyd liefert[3]). Ferner ist darauf hinzuweisen, daß auch jene, bei der Umsetzung von Zucker in Gegenwart von Zinksalzen zu beobachtende unerhebliche Steigerung an Aldehyd nur bei Heranziehung von Trockenhefepräparaten eintreten, dagegen völlig ausbleiben soll bei Anwendung von frischen Hefen, d. h. bei dem Normalvorgange der alkoholischen Zuckerspaltung. Eine Differenz zwischen den Erfahrungen von *Neuberg* und *Kerb* einerseits sowie denen von *Kostytschew* andererseits besteht zudem darin, daß erstere in Ansätzen von Trockenhefe allein mit Chlorzink und Wasser, d. h. ohne Beigabe von Zucker, kleine Acetaldehydmengen auftreten sahen. Dieses Verhalten, das für eine Auswertung der Befunde von Bedeutung ist, will *Kostytschew*[4]) auf ungleiche Eigenschaften der Hefenpräparate zurückführen; denn er gibt jüngst an, beobachtet zu haben, daß verschiedene Heferassen ganz enorme biochemische Unterschiede aufweisen.

Den Ausführungen von *Buchner*, *Langheld* und *Skraup* (l. c.), daß der Aldehyd sekundär entsteht infolge Begünstigung der Oxydation

---

[1]) *C. Neuberg* und *Joh. Kerb*, diese Zeitschr **48**, 494, 1912; **58**, 158, 1913.

[2]) *E. Buchner*, *K. Langheld* und *S. Skraup*, B. **47**, 2552, 1914.

[3]) *C. Neuberg* und *E. Reinfurth*, diese Zeitschr. **89**, 388, 1918 und B. **52**, 1696, 1919; *H. Kumagawa*, diese Zeitschr. **131**, 148, 1922.

[4]) Wenn er auch (l. c., S. 128) betont: „Keinmal war eine Bildung von Acetaldehyd aus Nichtzuckerstoffen zu verzeichnen", und wenn er hinzufügt: „Bei Abwesenheit von Chlorzink hat die von uns verwendete Trockenhefe selbst nach Vergärung von 20 g Zucker nicht die geringste Spur von Aldehyd erzeugt", so steht das nicht nur im Widerspruch mit den Erfahrungen von *C. Neuberg* u. *Joh. Kerb* (diese Zeitschr., l. c. u. **58**, 158, 1913; B. **47**, 2730, 1914), mit denen von *C. Neuberg* und *E. Schwenk* (diese Zeitschr. **71**, 126, 1915) sowie von *E. Zerner* (B. **53**, 334, 1920), sondern auch mit seinen eigenen Zahlen (auf S. 130 und 137/138 der Zeitschr. f. physiol. Chem. **111**). Hier gibt nämlich der russische Forscher für den ungezuckerten Zinkversuch $^1/_{10}$ der im Zucker-Zink-Ansatz erzielten Aldehydausbeute bzw. $^1/_6$ bis $^1/_7$ des im Zucker-Cadmium-Ansatz gefundenen Ertrages an. Ferner macht die von ihm im Experiment mit Bromcadmium aus 5 g Hefanol allein gewonnene Quantität von 3 mg Aldehyd beinahe die Hälfte des Quantums an Acetaldehyd aus, den die Ansätze mit der entsprechenden Menge von Zinksalzen, Hefepräparat plus Zucker ihm geliefert hatten.

normalerweise zuvor gebildeten Äthylalkohols, widerspricht[1]) *Kostytschew*. Das wichtigste Resultat aber, das der russische Autor mitteilt, wäre das erwähnte, daß unter dem Einflusse von Zink- oder Cadmiumverbindungen ein erheblicher Teil — bis zur Hälfte des durch Titration nicht feststellbaren Zuckers — in unbekannte Gärungserzeugnisse übergegangen sei. Dabei soll es sich nicht etwa um eine Bildung von Polysacchariden handeln, die aus dem scheinbar verschwundenen Zucker entstanden sind, sondern um unaufgeklärte Produkte eines biochemischen Zuckerumsatzes. Zu ihrer Schlußfolgerung sind *Kostytschew* und Mitarbeiter auf Grund der titrimetrischen Bestimmungen des noch unversehrten Zuckeranteils gelangt; dieselbe haben sie in ihren Mazeraten hauptsächlich nach der Vorschrift von *Bertrand* (zum Teil auch nach *Lehmann*) vorgenommen. Sie bemerken dazu, daß sie in einigen Versuchen die reichlich vorhandenen Aminoverbindungen nach einem Verfahren von *C. Neuberg* und *Joh. Kerb*[2]) entfernt hätten, wodurch aber die Resultate der Zuckeranalysen unverändert geblieben seien.

Bei der *Bertrand*schen Methode ist Voraussetzung ein vollständiger Ausfall des Kupferoxyduls, das abgesaugt, ausgewaschen und dann bestimmt wird durch Permanganattitration des Eisenoxydulsulfats, wie es beim Eintragen in eine Ferrisulfatlösung erzeugt wird[3]). Es ist nach meinen Erfahrungen aber gänzlich unmöglich, in einem Mazerat von Trockenhefe Kupferoxydul überhaupt oder einwandfrei zur Abscheidung zu bringen; denn selbstverständlich bleibt dasselbe in kolloidaler Lösung, indem sich die aus den Hefeeiweißkörpern entstandenen stickstoffhaltigen Substanzen teils als Lösungsmittel, teils als Schutzkolloide betätigen. Das steht vollkommen in Übereinstimmung mit analogen Erfahrungen von *Buchner* und *Hahn*[4]) und vielen anderen Autoren[5]). Man muß sich klar machen, was *Kostytschew* in seinen Versuchen bewirkt. Er fügt Trockenhefe zu der fünffachen Menge Wasser, erhält also zunächst einen Hefemazerationssaft, dessen Bestandteile durch mehrtägige Digestion alsdann einer mehr oder weniger weitgehenden Autolyse unterliegen[6]). Infolge der proteolytischen Vorgänge entstehen aus den nativen Eiweißkörpern der Hefe nicht koagulable

---

[1]) In Wirklichkeit tritt aber in den von *Kostytschew* zur Bekräftigung seiner Ablehnung mitgeteilten Beispielen (l. c., S. 137) gerade bei der Digestion von Trockenhefe, Metallsalz und verdünntem Weingeist 67 Proz. mehr Acetaldehyd auf als in der spritfreien Kontrolle.

[2]) *C. Neuberg* und *Joh. Kerb*, diese Zeitschr. **40**, 498, 1912; **67**, 119, 1914.

[3]) *G. Sonntag*, Chem. Centralbl. **1908**, I, 998; diese Zeitschr. **53**, 501, 1913.

[4]) *E.* u. *H. Buchner* sowie *M. Hahn*, Zymasegärung, S. 212.

[5]) z. B. *E. Buchner* und *R. Rapp*, B. **31**, 1085, 1898; *E. J. Lesser*, diese Zeitschr. **54**, 254, 1913; *M. v. Grab*, ebendaselbst **123**, 82, 1921; *R. Ege*, ebendaselbst **107**, 231, 1920.

[6]) Vgl. *N. N. Iwanoff*, diese Zeitschr. **120**, 25 und 62, 1921.

Albumosen, Peptone und auch Aminosäuren, deren Lösungskraft für Kupferoxydul eine allbekannte Erscheinung ist. Es ist daher schwerverständlich, wenn *Kostytschew* behauptet, daß er ein auf Abscheidung von Kupferoxydul gegründetes Verfahren zur Zuckerbestimmung habe anwenden können. Zur Aufhebung der störenden Einflüsse des stickstoffhaltigen Materials genügt auch nicht eine Vorbehandlung nach *Neuberg* und *Kerb*, die eine partielle Fällung von Aminosäuren durch Quecksilberacetat und Soda zuwege bringt, vielmehr haben *C. Neuberg* und *M. Ishida*[1]) ausdrücklich darauf aufmerksam gemacht, daß für eine wirklich quantitative Analyse des Zuckers in Eiweißverdauungsgemischen und ähnlichen stickstoffhaltigen Medien die kombinierte Reinigung mit Quecksilberacetat und Phosphorwolframsäure vorzunehmen ist. Die Brauchbarkeit dieses Verfahrens von *Neuberg* und *Ishida* ist mehrfach bestätigt worden[2]). Mit dieser Methode habe ich gearbeitet und dann feststellen können, daß *Kostytschews* Ergebnisse durch Unvollkommenheiten der Zuckertitration ihre Erklärung finden; denn in Wirklichkeit ist der scheinbar verschwundene und vermutetermaßen in unbekannte Umwandlungsprodukte übergegangene Zucker noch vorhanden. Er läßt sich in dem Gärgut, das nach *Neuberg* und *Ishida* von den Erzeugnissen der Trockenhefemazeration befreit ist, nicht nur titrimetrisch, sondern auch polarimetrisch feststellen, und zwar mit einer sehr befriedigenden Übereinstimmung zwischen beiden Verfahren.

Das Ergebnis meiner Untersuchungen war also, daß zwar eine geringfügige Erhöhung der Aldehydmenge über das bei der normalen Zuckerspaltung festgestellte Maß hinaus erfolgte, wenn die Vergärung in Gegenwart von Cadmiumsalzen geschah. Im übrigen aber beschränkte sich der Einfluß des Cadmiums auf eine teilweise Unterbindung[3]) des gesamten Gärungsvorganges[4]), und der vermißte Zucker fand sich unangegriffen in dem gereinigten Gärgute vor. Jene Beeinträchtigung des Gärungsablaufes, die Cadmiumverbindungen herbeiführen, konnte

[1]) *C. Neuberg* und *M. Ishida*, diese Zeitschr. **37**, 142, 1911.

[2]) z. B. *A. G. Hogan*, Biochem. Journ. **18**, 490, 1914; *F. Forschbach* und *H. Schäfer*, Arch. f. exper. Path. u. Pharm. **82**, 344, 1918.

[3]) Für lebende Hefe hat übrigens *Th. Bokorny* (Arch. f. d. ges. Physiol. **164**, 272, 1916) das gleiche konstatiert.

[4]) Auf eine eigentümliche Unstimmigkeit in *Kostytschews* Angaben hinsichtlich der Einwirkung $ZnCl_2$ auf die Gärung mit frischer Hefe stößt man bei Betrachtung seiner Tabelle 2 in H. **111**, 130. Hier ist verzeichnet, daß bei der Zuckervergärung in Gegenwart von Chlorzink einmal 15 g Alkohol aus 100 g Saccharose hervorgehen, das andere Mal 18,6 g aus 35 g Rohrzucker; die Mengen von Hefe, Metallsalz und Wasser waren in beiden Fällen gleich, nämlich 100 g Preßhefe, 20 g $ZnCl_2$ sowie 750 ccm H_2O. Bei Anwesenheit von 57 Proz. Chlorzink entstand also die theoretische Ausbeute an Sprit, in Gegenwart von nur 20 Proz. desselben giftigen Metallsalzes jedoch merkwürdigerweise lediglich $^1/_3$ des möglichen Quantums.

übrigens abgeschwächt oder beseitigt werden. Wenn man in das Gemisch von Trockenhefe, Zucker und Cadmiumsalz unmittelbar nach Zugabe des letzteren Schwefelwasserstoff einleitete, so ließ sich die lähmende Wirkung weitgehend aufheben.

Was die Deutung der kleinen Aldehydsteigerung anlangt, so ist *Kostytschew* jetzt[1]) geneigt, sie auf eine Beeinflussung der Reduktionsphase zu beziehen. Er stellt sich vor, daß die „Reduktase" durch Zink- wie Cadmiumverbindungen gehemmt werde und infolgedessen die normale Hydrierung des Acetaldehyds unterbleibe, also eine Anhäufung des Acetaldehyds stattfinden könne. Zum Beweise dessen führt er einen Versuch mit Methylenblau an, auf den in diesem Zusammenhange eingegangen werden muß. Er findet (H. **111**, 129) bei Zugabe von 10 g Methylenblau in hälftigen Anteilen zu einer Lösung von 100 g Rohrzucker in 750 ccm Wasser nach dreitägiger Vergärung mit der beträchtlichen Menge von 100 g frischer Hefe 0,088 g Acetaldehyd und 3,06 g Äthylalkohol. Obgleich Methylenblau, wie bekannt ist und der Autor auch selbst für seinen diesbezüglichen Versuch noch ausdrücklich bemerkt, von Preßhefe stark reduziert wird, an sich also den normalerweise zur Reduktion von Acetaldehyd dienenden Wasserstoff auf sich hätte ablenken können, beobachtete er lediglich eine Spur Acetaldehyd und eine ganz unverhältnismäßig geringfügige Menge von Weingeist, nämlich rund 3 g statt der zu erwartenden 52 g. Von einer eingreifenden Wirkung des Methylenblaus kann aber keine Rede sein. Schon *S. Lvoff*[2]) und *H. Stange*[3]) haben gezeigt, daß zugefügtes Methylenblau den Gärungsquotienten, d. h. das Verhältnis von C_2H_5OH zu CO_2, nicht verändert, und *C. Neuberg* und *W. Ursum*[4]) sowie *C. Neuberg* und *M. Ehrlich*[5]) haben dargetan, daß die Umsetzung des Zuckers in Gegenwart von Methylenblau vollständig ist, ja sogar stimuliert werden kann, daß aber bei den Endprodukten nach Art und Menge keine wesentliche Abweichung gegen die Norm zutage tritt. *Kostytschew*

---

[1]) Die ursprüngliche von *Kostytschew* gegebene Erklärung, daß Chlorzink den Acetaldehyd zu Paraldehyd kondensiere und somit anhäufe, ist nach *Neuberg* und *Kerb* (diese Zeitschr. **43**, 496, 1912) nicht haltbar und vom Autor (H. 85, 497, 1913) dann auch fallen gelassen; daß sie gar nicht in Betracht kommen kann, lehren meine im folgenden mitgeteilten Erfahrungen über eine die Aldehydbildung begünstigende Wirkung von verschiedenen Metallsalzen, denen gewiß die Fähigkeit abgeht, Acetaldehyd zu polymerisieren. Im übrigen sei darauf hingewiesen, daß auch bei der normalen Gärung Aldehydwerte gefunden worden sind (*Zerner*, l. c.), die kaum geringer sind als in *Kostytschews* Metallsalzversuchen.

[2]) *S. Lvoff*, Zeitschr. f. Gärungsphysiol. **3**, 311, 1913.

[3]) *H. Stange*, ebendaselbst **5**, 131 u. ff., 1916.

[4]) *C. Neuberg* und *W. Ursum*, diese Zeitschr. **110**, 193, 1920.

[5]) *C. Neuberg* und *M. Ehrlich*, ebendaselbst **101**, 276, 1920.

gibt als Stütze für seine Annahme eines spezifischen Einflusses von Cd auf die Hefereduktase folgendes an: „Methylenblau wird in Gegenwart einer ganz geringen Menge von $CdBr_2$ nicht entfärbt“. In Wirklichkeit aber ist die Menge von $CdBr_2$ gar nicht ganz gering, sondern größer als das Quantum Methylenblau. Er verwendet nämlich auf 0,02 g des Farbstoffes, der das Mol. Gew. 356 besitzt, 0,0001 Mol. $CdBr_2$, das ist 0,0272 g. Inzwischen hat übrigens *H. Kumagawa*[1]) nachgewiesen, daß gar keine Regelmäßigkeiten bezüglich des Einflusses von Metallsalzen auf die Entfärbung des Methylenblaus durch Trockenhefen bestehen, und er hat vor allen Dingen gefunden, daß $CdBr_2$ gerade Methylenblau in Form einer unlöslichen Doppelverbindung niederschlägt, wodurch der Farbstoff ja aus der Lösung entfernt wird und vor der Reduktion unter Umständen geschützt werden kann. Jedenfalls ist damit die Rolle, die $CdCl_2$ bei der Entfärbung von Methylenblau spielen kann, ausreichend erklärt.

Wie aus meinen nachstehenden Protokollen hervorgeht, entfaltet weder das Cd noch das Zn einen spezifischen Einfluß auf das Auftreten jener mehrfach erwähnten kleinen Aldehydmengen, indem auch andere Salze eine ähnliche Wirkung äußerten. Calciumsalze betätigten sich beispielsweise ähnlich den Zinkverbindungen; freilich war der Einfluß des Cd-Ions stärker[2]). Aldehyd„steigernd“ wirkten vor allem auch die Salze des Bariums, Calciums, Berylliums, Magnesiums, Eisens, etwas weniger die des Nickels, Zinns, Bleies, Aluminiums und Thalliums.

Meine diesbezüglichen Versuche habe ich mit zwei verschiedenen Heferassen ausgeführt, und zwar mit Hefe der Schultheiß-Patzenhofer-Brauerei und mit solcher der Brauerei Senst:

Auszüge aus den Protokollen.

A. Vorproben.

Wegen der von *Kostytschew* gemachten Voraussetzung, daß Zucker bei der Vergärung in Anwesenheit von $CdBr_2$ verschwinde, ohne in Form bekannter Spaltungsprodukte oder in Gestalt irgendwelcher Zuckerkondensationserzeugnisse aufzutreten, war meine erste Aufgabe, das analytische Verfahren zu prüfen, auf Grund dessen der Autor zur Annahme des Zuckerdefizits gelangt ist. Zu diesem Zwecke war zu untersuchen, *ob* die von *Kostytschew* hauptsächlich verwendete *Methode von Bertrand unter den obwaltenden Verhältnissen ohne weiteres benutzt werden kann.*

40 g Trockenhefe wurden in 200 ccm Wasser suspendiert und unter Zusatz von Toluol 4 Tage bei Zimmertemperatur belassen, dann wurde filtriert. Zu der klaren Flüssigkeit fügte ich wechselnde Mengen Trauben-

[1]) *H. Kumagawa*, diese Zeitschr. **121**, 150, 1921.

[2]) Es muß dahingestellt bleiben, ob dieser Umstand mit der bedeutenderen Giftigkeit des Cadmiums zusammenhängt, die auch erheblicher als die des Zinks ist. (*E. W. Schwartze* und *C. L. Alsberg*, Journ. of Pharm. and exper. Therap. **21**, 1, 1923.)

zucker und versuchte, diese eben nach *Bertrands* Vorschrift zu ermitteln. Dabei ergab sich, daß bei einem Gehalte von 1 Proz. Glucose kein Ausfall filtrierbaren Kupferoxyduls erfolgte. Beim Kochen mit der *Fehling*schen Mischung färbte sich das Gemenge lediglich gelblichrot; alles Kupferoxydul blieb in Lösung, und die durchscheinende Flüssigkeit wies ein deutliches Tyndallphänomen auf.

Steigerte ich den Zusatz von Traubenzucker auf 1,5 Proz., so trat bei Erwärmen mit einem erheblichen Überschuß von *Fehling*scher Flüssigkeit stärkere Trübung ein. ohne daß jedoch festes Kupferoxydul in wesentlicher Menge zur Abscheidung gelangte. Selbst bei einem Gehalt von 5 Proz. Glucose waren die Verhältnisse nicht viel anders. Erst bei Vorhandensein von 7,5 Proz. Traubenzucker fiel ein Niederschlag von Kupferoxydul aus, doch befanden sich auch jetzt noch Anteile in kolloidalem Zustande und in nicht filtrierbarer Suspension.

Wurde eine Lösung von Zucker in dem gefilterten Mazerate der Trockenhefen dagegen nach den Angaben von *Neuberg* und *Ishida* erst mit Quecksilberacetat und dann mit Phosphorwolframsäure gereinigt, so konnte nach Entfernung der Fällungsmittel in dem klaren Filtrat mit *Fehling*scher Lösung nunmehr der Zucker glatt nachgewiesen und Kupferoxydul zum regelrechten Absetzen gebracht werden. Auch die polarimetrische Bestimmung ergab nach der erwähnten Vorbehandlung, durch die optisch-aktive stickstoffhaltige Verbindungen entfernt werden, richtige Resultate.

B. Beispiele der Analysen verschiedener Göransätze.

a) Zuckerbestimmung.

1. Zu 20 g Traubenzucker in 100 ccm n/200 $CdBr_2$-Lösung wurden 20 g Trockenhefe und ½ ccm Toluol gefügt. Das Volumen des Gemisches betrug 125 ccm. Nach viertägiger Gärdauer wurden davon je 15,0 ccm mit 10,0 ccm konzentrierter Quecksilberacetatlösung gemischt und auf 30,0 ccm aufgefüllt. Davon wurden 15,0 ccm abfiltriert und mit 10,0 ccm Phosphorwolframsäure gefällt. Im Filtrat wurde entsprechend 1,196 bis 1,198 g Traubenzucker gefunden, während bei Ausbleiben jeglicher Vergärung darin 1,20 g hätten enthalten sein müssen.

b) Alkoholbestimmung.

Mit der gleichen Trockenhefe wurden folgende Versuche angestellt:

2. 20,0 g Traubenzucker in 100 ccm n/200 $CdBr_2$ unf 20 g Trockenhefe und ½ ccm Toluol.

3. 20,0 g Rohrzucker in 100 ccm n/200 $CdBr_2$ mit 20 g Trockenhefe sowie ½ ccm Toluol.

4. 20,0 g Trockenhefe mit 100 ccm n/200 $CdBr_2$ und ½ ccm Toluol.

5. 20,0 g Rohrzucker in 100 ccm Leitungswasser mit 20 g Trockenhefe und ½ ccm Toluol.

Die Ansätze 2 bis 5 standen 4 Tage bei Zimmertemperatur.

Die üblichen Bestimmungen ergaben für Ansatz 2: Alkohol = 230 mg, für Ansatz 3: Alkohol = 250 mg. Wie man wahrnimmt, ist durch das $CdBr_2$ die Gärung weitgehend unterbunden gewesen; damit steht im Einklange, daß im Ansatz 4 gar kein Sprit gefunden wurde, d. h. daß auch die

Selbstgärung, bei der Weingeist entstehen kann, in Gegenwart von $CdBr_2$ gehemmt war. Ansatz 5 lieferte 8,093 g Alkohol, also eine Menge, wie sie bei Verwendung von Trockenhefe nicht ungewöhnlich ist.

c) Bestimmung von Acetaldehyd in Gärgütern mit $CdBr_2$.

In einer Reihe von Ansätzen ermittelte ich die Mengen Acetaldehyd, die unter wechselnden Bedingungen sowie mit verschiedenen Ausgangsmaterialien auftraten, nach dem Verfahren von *Ripper*. Die Ergebnisse gehen aus nachstehender tabellarischer Übersicht hervor:

Nr.	Zusammensetzung	Temperatur °C	Gärdauer Tage	Ausbeute an Acetaldehyd in mg	Ausbeute an Acetaldehyd in Proz. des angewandten Zuckers
1	20 g Traubenzucker, 100 ccm n/200 $CdBr_2$, 20 g Trockenhefe S-P[1]), $^1/_2$ ccm Toluol	20	4	63	0,31
2	Desgleichen	36,5	4	14,8	0,07
3	20 g Rohrzucker, 100 ccm n/200 $CdBr_2$, 20 g Trockenhefe S-P, $^1/_2$ ccm Toluol	20	4	88	0,44
4	Desgleichen	20	3	75	0,37
5	Desgleichen mit CO_2 gesättigt	20	5	95	0,47
6	Desgleichen	36,5	4	32	0,16
7	20 g Rohrzucker, 100 ccm n/200 $CdCl_2$, 20 g Trockenhefe S-P, $^1/_2$ ccm Toluol	20	4	88	0,44
8	20 g Rohrzucker, 100 ccm n/200 $Cd(NO_3)_2$, 20 g Trockenhefe S-P, $^1/_2$ ccm Toluol	20	4	95	0,47
9	20 g Rohrzucker, 100 ccm n/200 $CdBr_2$, 20 g Trockenhefe S[2]), $^1/_2$ ccm Toluol	20	4	105	0,52
10	Kontrolle: 20 g Rohrzucker, 100 ccm H_2O, 20 g Trockenhefe S-P, $^1/_2$ ccm Toluol	20	4	Kaum wahrnehmbare Nitroprussidnatrium-Reaktion; Titration nicht ausführbar	
11	Kontrolle: 20 g Trockenhefe S-P, 100 ccm n/200 $CdBr_2$, $^1/_2$ ccm Toluol	20	4	Kaum wahrnehmbare Nitroprussidnatrium-Reaktion; Titration nicht ausführbar	
12	Kontrolle: Ebenso wie 10 mit Trockenhefe S	20	4	22	0,11
13	Kontrolle: Wie Nr. 11 mit Trockenhefe S	20	4	18	0,09

Der Zusammenstellung ist folgendes zu entnehmen: Die Aldehydausbeute war bei 20° etwas höher als bei 36,5°. Die Sättigung des Gärguts mit CO_2 war ohne sichtbaren Einfluß auf das Resultat. In den Kontrollversuchen ohne Cd-Salz waren nur Spuren von Acetaldehyd vorhanden.

[1]) S-P = Schultheiß-Patzenhofer.
[2]) S = Senst.

Ungleich verhielten sich die Proben, in denen zur Kontrolle Hefe ohne Zuckerbeigabe unter Zusatz von Cd-Salz digeriert war. Dabei trat in den Ansätzen mit Patzenhofer Hefe keine merkbare Menge Acetaldehyd auf, wohl aber bei gleicher Behandlung von Senst-Hefe. Hier machte der ohne Beifügung von Zucker erhaltene Aldehydertrag $^1/_5$ der Quantität aus, die in den zuckerhaltigen Gemischen nachgewiesen werden konnte. Im ganzen bewegten sich die Aldehydzahlen in den von *Kostytschew* angegebenen Grenzen. Ihre absolute Menge war nur gering, bezogen auf das Quantum des angewendeten Zuckers.

d) Bestimmung des Kohlendioxyds.

Die Ermittlung des CO_2 geschah durch gasvolumetrische Bestimmung in Eudiometerröhren über Quecksilber. Dabei ging ich folgendermaßen vor:

1. 10,0 ccm n/200 $CdBr_2$-Lösung wurden mit 2,0 g Traubenzucker und 2 g Trockenhefe sowie 0,3 ccm Toluol versetzt. Von dem gut durchgeschüttelten Gemische wurden 3,0 ccm abpipettiert und sofort in das Gasmeßrohr übergeführt.

2. Der gleiche Ansatz mit 2,0 g Rohrzucker.

3. Kontrollansatz mit 10,0 ccm n/200 $CdBr_2$, 2 g Trockenhefe und 0,3 ccm Toluol.

4. Cd-freie Kontrolle: 10,0 ccm Leitungswasser, 2,0 g Saccharose, 2 g Trockenhefe und 0,3 ccm Toluol.

Von den Ansätzen 2 bis 4 wurden gleichfalls 3,0 ccm nach gutem Umschütteln für die Gasmeßproben entnommen. Die Daten für CO_2 gibt folgende Zusammenstellung an:

Nach Stunden	Entwickelte ccm Kohlendioxyd im Ansatz				
	1	2	3	4	
$^1/_2$	0,5	0,6	0,5	0,8	Temperatur 20° C, Barometerstand 740—743 mm
1	1,1	1,4	1,1	2	
$1^1/_2$	—	1,6	—	4	
2	—	—	—	8	
$2^1/_2$	—	—	—	10	
3	—	—	—	11,7	
$3^1/_2$	—	—	—	13,3	
4	—	—	—	15,7	
5	—	—	—	18,5	
22	3,2	5	2,2	50,5	
48	5,8	8,5	3,2	89,5	

Wie man sieht, blieb in den Ansätzen von Glucose und Rohrzucker mit Cadmiumsalz die CO_2-Produktion nur geringfügig, während sie bei der Cd-freien Kontrollprobe dauernd vorwärtsschritt und nach 48 Stunden in der Hauptsache beendigt war.

C. Vergärung von Zucker durch Trockenhefe in Gegenwart anderer Metallsalze.

a) Aldehydwerte:

Nr.	Zusammensetzung	Temperatur °C	Gärdauer Tage	Ausbeute an Acetaldehyd in mg	Ausbeute an Acetaldehyd in Proz. des angewandten Zuckers
1	20 g Rohrzucker, 100 ccm n/200 KCl, 20 g Trockenhefe S-P, 1/2 ccm Toluol	20	4	12	0,06
2	20 g Rohrzucker, 100 ccm n/200 NaCl, 20 g Trockenhefe S-P, 1/2 ccm Toluol	20	4	12	0,06
3	20 g Rohrzucker, 100 ccm n/200 $MgCl_2$, 20 g Trockenhefe S-P, 1/2 ccm Toluol	20	4	19	0,09
4	20 g Rohrzucker, 100 ccm n/200 $CaCl_2$, 20 g Trockenhefe S-P, 1/2 ccm Toluol	20	4	22	0,11
5	20 g Rohrzucker, 100 ccm n/200 $BaCl_2$, 20 g Trockenhefe S-P, 1/2 ccm Toluol	20	4	20	0,10
6	20 g Rohrzucker, 100 ccm n/200 $ZnCl_2$, 20 g Trockenhefe S-P, 1/2 ccm Toluol	20	4	25	0,13
7	20 g Rohrzucker, 100 ccm n/200 $BeSO_4$, 20 g Trockenhefe S-P, 1/2 ccm Toluol	20	4	20	0,10
8	20 g Rohrzucker, 100 ccm n/200 $AlCl_3$, 20 g Trockenhefe S-P, 1/2 ccm Toluol	20	4	14	0,07
9	20 g Rohrzucker, 100 ccm n/200 $TlCl_3$, 20 g Trockenhefe S-P, 1/2 ccm Toluol	20	4	16	0,08
10	20 g Rohrzucker, 100 ccm n/200 $MnSO_4$, 20 g Trockenhefe S-P, 1/2 ccm Toluol	20	4	(Schwach wahrnehmbare Nitroprussidnatrium-Reaktion). 8	0,04
11	20 g Rohrzucker, 100 ccm n/200 $Pb(NO_3)_2$, 20 g Trockenhefe S-P, 1/2 ccm Toluol	20	4	18	0,09
12	20 g Rohrzucker, 100 ccm n/200 $SnCl_4$, 20 g Trockenhefe S-P, 1/2 ccm Toluol	20	4	16	0,08
13	20 g Rohrzucker, 100 ccm n/200 $FeSO_4$, 20 g Trockenhefe S-P, 1/2 ccm Toluol	20	4	25	0,13
14	20 g Rohrzucker, 100 ccm n/200 $NiSO_4$, 20 g Trockenhefe S-P, 1/2 ccm Toluol	20	4	18	0,09
15	20 g Rohrzucker, 100 ccm n/200 $CuCl_2$[1]), 20 g Trockenhefe S-P, 1/2 ccm Toluol	20	4	(Schwach wahrnehmbare Nitroprussidnatrium-Reaktion). 6	0,03
16	Kontrolle: 20 g Rohrzucker, 20 g Trockenhefe S-P, 100 ccm H_2O, 1/2 ccm Toluol	20	4	(Schwach wahrnehmbare Nitroprussidnatrium-Reaktion). 6	0,03

[1]) Vgl. *K. Schweizer*, Bull. Assoc. Chim. de Sucr. et Dist. **37**, 160, 1919.

b) Entwickelte Kohlensäure.

Nr.	Zusammensetzung	Gärdauer nach Tagen	Entwickelte ccm CO_2
1	2 ccm n/200 $AlCl_3$, 0,4 g Traubenzucker, 0,4 g Trockenhefe S-P, 0,3 ccm Toluol	1 2	17,2 21,5
2	2 ccm n/200 $CuCl_2$, 0,4 g Traubenzucker, 0,4 g Trockenhefe S-P, 0,3 ccm Toluol	1 2	1,5 2,5
3	2 ccm n/200 $CdBr_2$, 0,4 g Traubenzucker, 0,4 g Trockenhefe S-P, 0,3 ccm Toluol	1 2	3,0 5,0
4	2 ccm n/200 $MgCl_2$, 0,4 g Traubenzucker, 0,4 g Trockenhefe S-P, 0,3 ccm Toluol	1 2	21 23
5	2 ccm n/200 $MnSO_4$, 0,4 g Traubenzucker, 0,4 g Trockenhefe S-P, 0,3 ccm Toluol	1 2	13,5 16
6	2 ccm n/200 $BeSO_4$, 0,4 g Traubenzucker, 0,4 g Trockenhefe S-P, 0,3 ccm Toluol	1 2	18 21
7	Kontrolle: 0,4 g Traubenzucker, 0,4 g Trockenhefe S-P, 2 ccm Wasser, 0,3 ccm Toluol	1 2	53 Rohr ausgegoren

Aus dieser Tabelle geht hervor, daß $CuCl_2$ die Gärung in n/200 Lösung stärker hemmte als $CdBr_2$, während die anderen Salze den Zuckerumsatz nur in mäßigerem Umfange beeinträchtigten.

D. Versuche über die Aufhebung der Cd-Hemmung durch Behandlung mit Schwefelwasserstoff.

Durchperlte man die Suspension von Trockenhefe in zuckerhaltiger n/200 $CdBr_2$-Lösung mit H_2S, so trat alsdann Vergärung in beträchtlichem Ausmaß ein.

Beispiele:

Nr.	Zusammensetzung	Gärdauer nach Tagen	Entwickelte ccm CO_2
1	2 ccm n/200 $CdBr_2$, 0,4 g Traubenzucker, 0,4 g Trockenhefe S-P, 0,3 ccm Toluol	1 2 3	4,2 6,5 8
		Von da an unverändert	
2	2 ccm n/200 $CdBr_2$, 0,4 g Traubenzucker, 0,4 g Trockenhefe S-P, 0,3 ccm Toluol, mit H_2S gesättigt	1 2 3 4	5,6 13,4 21 25,2

Es muß jedoch bemerkt werden, daß nicht in allen Fällen diese Belebung der Gärung erfolgte; am besten gelang dies unter den angegebenen Bedingungen bei der Patzenhofer Hefe.

Beiträge zur Kenntnis der physiologischen Wirkung der proteinogenen Amine.

VIII. Mitteilung.

Über die lokalanästhetischen und narkotischen Wirkungen des Phenyläthylamins und einiger seiner Derivate.

Von

J. Abelin.

(Aus dem physiologischen Institut der Universität Bern.)

(Eingegangen am 23. Juli 1923.)

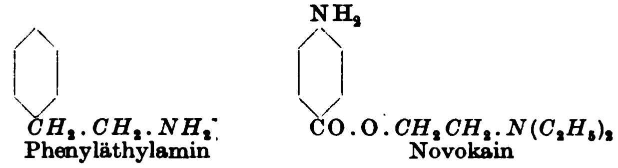
Phenyläthylamin ($C_6H_5 . CH_2 . CH_2 . NH_2$) ist das erste Glied einer großen und wichtigen Reihe von zyklischen Alkylaminen. Synthetisch kann es zwar auf verschiedenem Wege hergestellt werden, für seine Bildung im tierischen und pflanzlichen Organismus kommt aber höchstwahrscheinlich nur die CO_2-Abspaltung aus Phenylalanin in Betracht. Die physiologischen Wirkungen des Phenyläthylamins, die mit seinen sogenannten sympathomimetischen Eigenschaften in Zusammenhang stehen, sind bereits zahlreich beschrieben[1]). Es soll nun im folgenden eine *neue Eigenschaft* des Phenyläthylamins besprochen werden, welche beim Studium des Einflusses der proteinogenen Amine auf die Metamorphose der Froschlarven festgestellt und in einer früheren Mitteilung bereits kurz erwähnt wurde[2]). Es handelt sich um die lokalanästhetische und narkotische Wirkung des Phenyläthylamins, welche sich sowohl am Nervenmuskelpräparat, am Reflexfrosch (*Türk*), an der Schleimhaut der menschlichen Zunge, als auch besonders schön in Versuchen an Froschlarven demonstrieren läßt.

Für die Erforschung der Zusammenhänge zwischen chemischer Konstitution und physiologischer Wirkung einer Substanz stellen die Lokalanästhetika und die Narkotika eine besonders günstige Gruppe dar. Die Erfahrung an einer sehr großen Zahl von synthetisch hergestellten Verbindungen spricht unzweifelhaft dafür, daß der spezifische

---

[1]) Vgl. *M. Guggenheim*, Die biogenen Amine. J. Springer, 1920.
[2]) Vgl. IV. Mitteilung, diese Zeitschr. **102**, 84, 1920.

Aufbau des Moleküls, wenn nicht gerade einzig und allein maßgebend, so doch sehr wichtig für das Zustandekommen der Wirkung ist. Beim Phenyläthylamin liegen die Verhältnisse insofern günstig und übersichtlich, als es sich hier um einen relativ einfach gebauten Körper handelt. Außer dem Phenylrest enthält es die Äthylaminogruppe ($-CH_2 . CH_2 . NH_2$), die vom chemischen Standpunkte aus als die Hauptträgerin der lokalanästhetischen Wirkung anzusehen ist. Diese Gruppe verleiht dem Molekül die basischen Eigenschaften, die für die Lokalanästhesie besonders wichtig sind. Wie ein Blick auf die nebenstehenden Formeln zeigt, begegnen wir auch der Atomgruppierung —C—C—N < bei vielen bewährten lokalanästhetisch wirkenden Mitteln. Sie ist z. B. im Novocain selbst und in zahlreichen Derivaten desselben vertreten.



Phenyläthylamin Novokain

Auch das sogenannte Nirvanin enthält eine Kette aus zwei C-Atomen und einem N-Atom in Form des Diäthylglycylrestes. Benzoyl-β-oxy-α-diäthylaminoäthyl-buttersäure-äthylester,

$$\begin{array}{l} \quad\quad\; O.CO.C_6H_5 \\ \quad\quad\;\; |\beta \quad\;\; \alpha \\ CH_3.CH.CH.COOC_2H_5 \\ \quad\quad\quad\quad\;\; | \\ \quad\quad\quad\quad CH_2.CH_2.N(C_2H_5)_2 \end{array}$$

ein neues Lokalanästhetikum, welches von *K. Fromherz*[1]) empfohlen wurde, enthält ebenfalls diese charakteristische Atomanordnung. Die Verknüpfung des Radikals —C—C—N mit dem übrigen Teil des Moleküls ist zwar bei all diesen Verbindungen keine einheitliche. Im Phenyläthylamin ist der —C—C—N-Rest direkt an den Benzolkern und in der genannten, von *Fromherz* untersuchten Substanz an die C-Kette der Buttersäure gebunden. Dagegen haben wir im Novokain eine esterartige Bindung und im Nirvanin eine Aminoacylverbindung. Doch ist die Grundwirkung des Radikals C—C—N überall erhalten. Dieses häufige Vorkommen der C—C—N-Gruppe bei lokalanästhetisch wirkenden Stoffen ist wohl kaum einem Zufall zuzuschreiben. Vielmehr erscheint es wahrscheinlich, daß wir es hier mit einer für die Auslösung der Lokalanästhesie besonders günstigen Struktur zu tun haben.

Welche Bedeutung dem Phenyl-, dem Äthylrest sowie der Aminogruppe *einzeln* zukommt, ist schwer zu sagen. Wir finden folgendes.

---

[1]) *K. Fromherz*, Arch. f. exper. Path. u. Pharm. **98**, 34, 1922.

Der Ersatz der Aminogruppe durch die Hydroxylgruppe führt vom Phenyläthylamin zum Phenyläthylalkohol ($C_6H_5 . CH_2 . CH_2 . OH$), der nach Versuchen von *Hjort* und *Kaufmann*[1]) sowie von *K. Fromherz*[2]) ebenfalls lokalanästhetische Eigenschaften besitzt. Die Abkürzung der Seitenkette des Phenyläthylamins bzw. des Phenyläthylalkohols um ein C-Atom ergibt das Benzylamin bzw. den Benzylalkohol. Beide Stoffe besitzen lokalanästhetische Eigenschaften. Auf die lokalanästhetischen Wirkungen der Benzylderivate hat zuerst *G. Bufalini*[3]) aufmerksam gemacht. In neuerer Zeit wurden die Benzylderivate besonders eingehend von *Macht*[4]) studiert. 1- bis 4 proz. Suspensionen von Benzylalkohol werden von *Macht* zu anästhetischen Zwecken empfohlen. Die Benzylderivate verdienen noch aus dem Grunde ein besonderes Interesse, weil viele von ihnen neben der lokalanästhetischen auch noch spasmolytische Wirkungen besitzen.

Nicht ohne Interesse ist auch der *Einfluß der Substitution* im Benzolkern auf die Intensität der lokalanästhetischen Wirkung des Phenyläthylamins. Die Einführung einer paraständigen Aminogruppe oder einer Acyl-aminogruppe in das Molekül des Phenyläthylamins schwächt die lokalanästhetische Kraft wesentlich ab. Auch der Eintritt einer Hydroxylgruppe und somit die Überführung des Phenyläthylamins in das p-Oxy-phenyläthylamin (Tyramin) ist von einer starken Abschwächung der anästhetischen Wirkung begleitet. Letztere Tatsache ist noch insofern von Bedeutung, als die sympathomimetischen Wirkungen umgekehrt beim Tyramin bedeutend intensiver sind als beim Phenyläthylamin. Man findet auch hier einen Beleg dafür, daß durch die chemische Modellierung nicht alle Wirkungen des Moleküls gleichmäßig betroffen werden, sondern daß dabei elektive Verstärkungen oder Abschwächungen zustande kommen. Ein ähnliches Beispiel wurde in der siebenten Mitteilung dieser Beiträge besprochen. Es konnte dort gezeigt werden, daß durch die Jodierung des Tyramins seine Stoffwechselwirkung aufgehoben, sein Einfluß auf die Amphibienlarvenmetamorphose aber außerordentlich stark erhöht wird. — Durch zweifache Methylierung an der Aminogruppe gelangt man vom Tyramin zum Hordenin [$HO . C_6H_4 . CH_2CH_2 . N(CH_3)_2$]. Die Einführung dieser beiden Methylgruppen bringt eine Verstärkung der Narkosewirkung mit sich. Es gelingt z. B., mit einer m/200 Lösung von Hordeninsulfat nach Alkalizusatz Froschlarven zu narkotisieren. Doch

---

1) *Hjort* und *Kaufmann*, Journ. of pharm. and exper. Therap. **15**, 1920: Proc. of the soc. exper. biol. and med. **17**. New York 1920.

2) *K. Fromherz*, l. c.

3) *G. Bufalini*, Atti della reale ac. d. Linc. di Roma **54**, 195, 1900.

4) *Macht*, Journ. of Pharm. and exper. Therap. 1917, 1918, 1919, 1920.

bleibt die narkotische Kraft des Hordenins weit hinter derjenigen des Phenyläthylamins zurück. [Die benötigten Mengen von Phenyläthylamin, Tyramin, Hordenin und der anderen hier benutzten Präparate wurden mir von der Gesellschaft für Chemische Industrie in Basel („Ciba") zur Verfügung gestellt, wofür ich auch an dieser Stelle danken möchte.]

So wichtig auch der chemische Aufbau des Moleküls für den Eintritt der lokalanästhetischen und narkotischen Wirkung ist, so ist er doch andererseits nicht einzig und allein maßgebend. Die Mitbeteiligung physikalisch-chemischer Faktoren (veränderte Permeabilität, Oberflächenspannung, H^+-Konzentration) bei der Ausbildung der Lokalanästhesie tritt auch beim Phenyläthylamin sehr deutlich hervor, und zwar besonders dann, wenn man an Stelle der freien Base ihre Salze verwendet. Anlaß zur Prüfung dieser Frage gab ein Versuch, in welchem an Stelle des freien Phenyläthylamins die äquivalente Menge seines gut kristallisierenden salzsauren Salzes verwendet wurde. Mit dieser salzsauren Lösung konnte an der Zungenschleimhaut keine Anästhesie erzielt werden. Nach Zusatz von Sodalösung bis zur schwach alkalischen Reaktion wurde die Lösung wirksam. Vergleichsversuche haben dann gezeigt, daß auch bei der Narkose des isolierten Nerven oder der Froschlarven, sowie bei der Gelatinequellung die gleich großen Unterschiede in der Wirkung des freien und des salzsauren Phenyläthylamins bestehen. Auch das essigsaure, weinsaure, oxalsaure und citronensaure Salz des Phenyläthylamins erwiesen sich schwächer wirksam als das Phenyläthylamin selbst. Es ergab sich somit, daß die Anwesenheit einer Säurekomponente die lokalanästhetische Wirkung des Phenyläthylamins schwächt. Eine Erklärung dieses Phänomens könnte entweder in einer Änderung der Oberflächenspannung oder in einer Verschiebung der H^+-Konzentration gesucht werden. Änderungen in der Oberflächenspannung könnten hier mitspielen, da *J. Traube* gezeigt hat, daß eine große Reihe von narkotisch wirkenden Stoffen die Oberflächenspannung des Wassers herabsetzt. Auch das Phenyläthylamin gehört zu den oberflächenaktiven Stoffen. Die Herabsetzung der Oberflächenspannung, die z. B. eine m/10 Phenyläthylaminlösung bewirkt, ist eine recht erhebliche. Bei einer Tropfenzahl von 84 für destilliertes Wasser finden wir bei einer m/10 Phenyläthylaminlösung eine solche von 151 bis 152, also beinahe eine Verdoppelung der Tropfenmenge. Es wäre möglich, daß durch das Hinzutreten der Säurekomponente die Oberflächenspannung der Phenyläthylaminlösungen eine Änderung erfährt. Stalagmometrische Untersuchungen haben aber gezeigt, daß bei den verwendeten, stark verdünnten Phenyläthylaminsalzlösungen (m/200) dies kaum in Betracht fällt. Die Messung ergab folgendes Resultat:

	Tropfenzahl
Destilliertes Wasser	84
m/200 Phenyläthylamin.	87
m/200 salzsaures Phenyläthylamin . . .	84—85
m/200 essigsaures ,, ...	85
m/200 weinsaures ,, ...	87
m/200 citronensaures ,, ...	85
m/200 oxalsaures ,, . . .	84—85
m/200 Phenyläthylamin in einer Phosphatpuffermischung ($p_H = 7{,}2$)	85

Es ist sicher von Interesse, festzustellen, daß selbst in einer Verdünnung von m/200 das Phenyläthylamin die Oberflächenspannung des Wassers beeinflußt, und daß die Salze des Phenyläthylamins, der allgemeinen Regel gemäß, sich in dieser Beziehung als schwächer wirksam erweisen. Doch sind die Differenzen zu gering, um die sehr bedeutenden Unterschiede in der Wirkung des freien Phenyläthylamins einerseits und seiner Salze andererseits zu erklären. Viel deutlicher als in der Oberflächenspannung sind aber die Unterschiede in der H^+-Konzentration der benutzten Lösungen.

Der Gehalt an freiem Wasserstoffion, gemessen mit m-Nitrophenol nach *Michaelis*, ist:

Präparat	Konzentration	p_H	Narkotische Wirkung auf Froschlarven
Phenyläthylamin	m/200	8,4 — 8,5	stark
,, -HCl	m/200	7,0	keine
,, -Acetat	m/200	7,0	-
,, -Tartrat	m/200	7,5	-
,, , citronensaures	m/200	7,2	-
,, , oxalsaures	m/200	7,0	-
Phenyläthylamin in Phosphatpuffergemisch (40 ccm . m/10 NaH_2PO_4 + 60 ccm . m/10 Na_2HPO_4)	m/200	7,2	-

Während also die m/200 Lösung des *salzsauren*, *essigsauren*, *weinsauren* oder *citronensauren* Phenyläthylamins eine H^+-Konzentration aufweist, die sich in der Nähe des Neutralpunktes bewegt ($p_H = 7{,}0$ bis 7,2), finden wir bei der m/200 Lösung des freien Phenyläthylamins eine ausgesprochen alkalische Reaktion ($p_H = 8{,}4$ bis 8,5). Und darauf ist wahrscheinlich die stärkere lokalanästhetische Wirkung der Phenyläthylaminbase zurückzuführen. In der Tat haben die Untersuchungen von *Groß*, *J. Traube*, *L. Michaelis*, *Labes* u. a. gezeigt, daß bei einer großen Anzahl von narkotisch und lokalanästhetisch wirkenden Stoffen der Gehalt an H^+ von ausschlaggebender Bedeutung ist. *Marian M. Crane*[1]) hat gefunden, daß die Giftigkeit der Alkaloide gegenüber

[1]) *Marian M. Crane*, Journ. Pharm. and exper. Therap. 18, 1921; zit. nach Chem. Zentralbl. 1922, I, S. 655.

Paramäcien ebenfalls von der H^+-Konzentration abhängt: eine schwach alkalische Reaktion erhöht, eine schwach saure Reaktion setzt die Giftigkeit herab. — Die maßgebende Rolle der H^+-Konzentration für die Phenyläthylaminwirkung geht auch aus den Versuchen bei Anwendung eines neutralen Puffergemisches hervor. Verwendet man eine an und für sich wirksame m/200 Lösung von Phenyläthylamin in einem Phosphatgemisch mit $p_H = 7{,}2$, so bleibt jede narkotische Wirkung auf die Kaulquappen aus.

Schryver[1]) hat darauf aufmerksam gemacht, daß oberflächenaktive Stoffe, wie z. B. die Narkotika, die Gelbildung hemmen. *J. Traube*[2]) hat dann gefunden, daß Narkotika das Quellungsvermögen von Gelen erhöhen. Die Bedeutung der Quellungsvorgänge für die Narkose geht besonders aus den Arbeiten von *R. Höber*[3]) hervor. Auch Phenyläthylamin wirkt fördernd auf die Quellung von Gelatine. Dabei spielt aber auch der Gehalt an H^+ eine sehr erhebliche Rolle, und in einer Lösung der Phenyläthylaminbase quillt z. B. die Gelatine viel schneller und hauptsächlich viel ausgiebiger als in einer gleich konzentrierten Lösung eines Phenyläthylaminsalzes. Bei den Quellungsversuchen muß allerdings außer der H^+-Konzentration noch die Anwesenheit anderer Anionen und Kationen berücksichtigt werden. So wird z. B. die quellungsfördernde Kraft des Phenyläthylamins auch dann stark herabgesetzt, wenn man an Stelle von Essigsäure Natriumacetat oder an Stelle von Weinsäure Kalium- oder Natriumtartrat nimmt. In diesen Fällen wird die Quellung durch die Salze gehemmt, wobei erfahrungsgemäß die Anionen stärker hemmend wirken als die Kationen (vgl. Tabelle III).

Experimenteller Teil.

A. Versuche am Nervmuskelpräparat des Frosches.

Der Ischiadicus wird vom Plexus aus seiner ganzen Länge nach abpräpariert und mit dem Unterschenkel in Verbindung gelassen. Das freiliegende Nervenende wird mit einem Faden umbunden. Auf diese Weise lassen sich Zerrungen der Nerven bei der Verlagerung des Nervmuskelpräparates am leichtesten vermeiden. Am besten hat sich folgende Arbeitsweise erwiesen.

Das Nerv-Muskelpräparat kommt auf einen Paraffinblock von 12 cm Länge und 5 cm Breite. In der Mitte des Blocks befindet sich eine Vertiefung, die zur Aufnahme des Anästhetikums dient. An den Rändern dieser Vertiefung werden zwei Paar sogenannte Gummielektroden befestigt. Jedes Paar dieser Elektroden wird mit zwei nebeneinanderliegenden Klemm-

---

[1]) *Schryver*, Proc. Roy. Soc. London **87**, **366**, **1914**.
[2]) *J. Traube*, Pflügers Arch. **160**, 501.
[3]) *R. Höber*, ebendaselbst **120**, 1907; Deutsch. med. Wochenschr. **1915**, Nr. 10.

schrauben einer *Pohl*schen Wippe ohne Kreuz verbunden. Die beiden Drähte aus der sekundären Rolle kommen in die gegeneinanderliegenden, in der Mitte der *Pohl*schen Wippe sich befindenden Klemmschrauben. Der Versuch verläuft in folgender Weise. Das Nerv-Muskelpräparat kommt auf den Paraffinblock. Der proximale Teil des Nerven wird auf das eine Paar der Gummielektroden gebracht. Der nächste Abschnitt des Nerven wird in das noch leere Grübchen des Paraffinblocks eingesenkt, der darauf folgende Teil des Nerven befindet sich auf dem zweiten Paar der Gummielektroden. Durch Umlegung der Wippe bestimmt man die Erregbarkeit des proximalen und des distalen Teiles des Nerven. Man benutzt dazu tetanische Reize. Der eben wirksame tetanische Reiz ist in der Tabelle in *Kronecker*-Einheiten angegeben. In den allermeisten Fällen besitzen der proximale und der distale Nerventeil die gleiche Erregbarkeit. Dann wird mit Hilfe einer Pipette eine abgemessene Quantität der Anästhesielösung in die Vertiefung des Blocks gebracht und einige Minuten auf den Nerven einwirken gelassen. Mit Hilfe der gleichen Pipette wird dann die Lösung entfernt, wobei etwaige noch übrig gebliebene Spuren der Anästhesielösung mit Wattebäuschchen abgetrocknet und mit Tyrodelösung abgespült werden. Jetzt wird die Erregbarkeit der auf den Elektroden liegenden Nerventeile wieder geprüft. Man kontrolliert in dieser Weise von Zeit zu Zeit die Nervenerregbarkeit, wobei in den Zwischenperioden der Paraffinblock in einer feuchten Kammer aufbewahrt wird. Will man die Anästhesie beseitigen, so bringt man in das Grübchen Tyrodelösung und läßt den Nerv eine gewisse Zeitlang darin. Vor der erneuten Prüfung der Erregbarkeit wird die Tyrodelösung wieder entfernt.

Wie Tabelle I zeigt, handelt es sich beim Phenyläthylamin um ein sehr stark wirksames Anästhetikum. So war z. B. im Versuch 2 der Nerv vor der Anästhesie sehr leicht erregbar. Eine starke Zuckung trat noch bei einem Rollenabstand von 50 cm und bei einem Winkel der beiden Rollen von 60° ein. Darauf kam ein Teil des Nerven für 1 Minute in $^1/_2$ proz. Phenyläthylaminlösung. 10 Minuten darauf war der Reiz erst bei einem Rollenabstand von 5 cm bei paralleler Lage der beiden Rollen eben wirksam. Also ganz erhebliche Differenzen. An der nicht anästhesierten Nervenstelle hat sich die Erregbarkeit nicht geändert. Nach Hineinbringen in Tyrodelösung trat eine allmähliche Wiederherstellung der Erregbarkeit ein, sie blieb aber immer hinter der ursprünglichen Empfindlichkeit zurück. Das gleiche Bild ergibt sich auch in den anderen Versuchen, in welchen entweder die Konzentration der Phenyläthylaminlösung oder die Zeitdauer ihrer Einwirkung variiert wurde. Nicht ohne Interesse sind die Vergleichsversuche zwischen der Wirkung des *salzsauren* Phenyläthylamins und des Phenyläthylamins selbst (der freien Base) (vgl. Versuche Nr. 6 und 7). Man erkennt die viel stärkere Wirkung der freien Base gegenüber ihrem salzsauren Salz. So ergibt z. B. eine 1 proz. Lösung von Phenyläthylamin selbst nach kurzer Einwirkung eine komplette Aufhebung der Erregbarkeit (Versuche Nr. 1 und 8). Eine gleich konzentrierte Lösung von *salzsaurem* Phenyläthylamin erzeugt aber nur eine partielle Herabsetzung der Empfindlichkeit; eine Zuckung wird noch bei einem Rollenabstand von 50 cm (wie vor der Anästhesie) und bei einem Winkel von 5° (Versuche Nr. 6 und 7) hervorgerufen. Im Versuch Nr. 7 hat die $^1/_4$ proz. Lösung des Phenyläthylamins viel stärker gewirkt als die *1 proz.* Lösung des *salzsauren* Phenyläthylamins. Ein Vergleich mit Cocain ist im Versuch Nr. 9 (Tabelle Ia) enthalten. Eine 1 proz. Cocainhydrochlorlösung hat bei 2 Minuten langer

Einwirkung eine unwesentliche Veränderung der Erregbarkeit hervorgerufen. Als dann der gleiche Nerv für 2 Minuten in eine 1proz. Lösung von Phenyläthylamin kam, sank die Erregbarkeit von 10 auf 800 *Kronecker*-Einheiten. Es ist allerdings möglich, daß es sich hier noch um eine gegenseitige Verstärkung der beiden Präparate handelt, da nach den Untersuchungen von *E. Bürgi*[1]) auch die Lokalanästhetika sich in ihrer Wirkung gegenseitig verstärken.

B. Versuche an Froschlarven.

Für das Studium der Narkosewirkung sind Versuche an Kaulquappen sehr geeignet (*Overton*). Der Effekt der Wirkung läßt sich hier von Anfang bis zu Ende in einfacher und genauer Weise verfolgen. Setzt man dem Wasser etwas Phenyläthylamin zu, so sieht man, daß die Larven allmählich Seiten- und Rückenlage annehmen und zuerst vorübergehend, dann aber längere Perioden in dieser unnatürlichen Haltung bleiben. Zuletzt hören die Spontanbewegungen auf. Werden die Tiere in diesem Stadium in frisches Wasser gebracht, so erfolgt langsam eine Erholung, die zum vollständigen Erwachen führt. Ein großer Vorteil dieser Versuche besteht ferner darin, daß man gleichzeitig an einer großen Anzahl von Tierchen den Versuch anstellen kann, wodurch individuelle Verschiedenheiten zu einem gewissen Teil ausgeglichen werden.

Auch diese Narkoseversuche zeigen die wesentlich verschiedene Wirkung der Phenyläthylaminbase und ihrer Salze, wobei auch hier das Phenyläthylamin sich viel stärker wirksam erweist. Zu allen Versuchen dienten gleich konzentrierte Phenyläthylaminlösungen. Werden einige Kaulquappen in 100 ccm einer n/500 Phenyläthylaminlösung gebracht, so tritt nach etwa 15 bis 20 Minuten vollständige Narkose ein. In einem Parallelversuch mit 100 ccm einer n/500 *salzsauren* Phenyläthylaminlösung tritt die Narkose erst nach 2½ Stunden ein! Und mit gleich konzentrierten Lösungen von *essigsaurem* oder *oxalsaurem* Phenyläthylamin ist eine Narkose überhaupt nicht zu erzielen. In der Phenyläthylamin*tartrat*- und *citrat*lösung nehmen die Tiere nach 3¾ Stunden Rückenlage ein, aber nur vorübergehend, eine wahre Narkose bildet sich nicht aus. Ein analoges Resultat ergeben auch die Versuche mit n/200 Lösungen. Wird eine sonst wirksame Menge von Phenyläthylamin in einem neutral reagierenden Phosphatpuffergemisch aufgelöst, so bleibt die Narkosewirkung auf die Kaulquappe aus. Die Bedeutung der H^+, sowie anderer Kationen und Anionen für die Ausbildung der Narkose tritt in all diesen Versuchen sehr deutlich hervor.

Wässerige Lösungen von Phenyläthylamin reagieren alkalisch, und es könnte vielleicht gerade die Anwesenheit von OH^- für die intensivere Wirkung der Phenyläthylaminbase verantwortlich gemacht werden. Der Aufenthalt der Kaulquappen in einer stark oder schwach alkalischen Lösung (m/20 oder m/100 Na_2HPO_4) ruft keine Narkoseerscheinungen hervor. Ebenso führt eine Vermehrung der OH^- (z. B. durch Zusatz von alkalischem Phosphat) nicht zu einer Verstärkung der Phenyläthylaminwirkung (vgl. vorletzten Versuch, sowie den Versuch mit der alkalischen Phosphatmischung der Tabelle II).

---

[1]) *E. Bürgi* und Mitarbeiter, Arch. f. exper. Path. u. Pharm. 1907 u. f.

Tabelle I. **Wirkung des Phenyläthylamins und seiner Salze auf das Nerv-Muskelpräparat des Frosches.**

Nr.	Datum 1918	Erregbarkeit des Nerven *vor* der Anästhesie. Öffnungszuckung bei Abstand d. beiden Rollen	Winkel d. beiden Rollen	Präparat und Konzentration desselben	Dauer d. Einwirkung des Anästhetikums auf den Nerv	Erregbarkeit des Nerven *nach* der Anästhesie: Minuten nach der Anästhesie	Öffnungszuckung bei Abstand der beiden Rollen	Winkel der beiden Rollen	Kontrolle. Erregbarkeit des nicht anästhetisierten Nerventeiles: Min. nach Beginn des Versuches	Öffnungszuckung bei Abstand der beiden Rollen	Winkel der beiden Rollen	Erregbarkeit des anästhetis. Nerventeiles nach Hineinbringen desselben in Tyrodelösung: Nach Minuten in Tyrodelösung	Öffnungszuckung bei Abstand der beiden Rollen	Winkel der beiden Rollen
1	20. VIII.	50 cm	65°	*Phenyläthylamin*, 1 Proz. in Tyrodelösung	3′	5′	0	0°	5′	50 cm	45°			
							vollst. Anästhesie							
						20	0	0°	20	50 „	45			
									45	50 „	45	25′	15 cm	0°
									75	50 „	55	55	18 „	0
2	21. VIII.	50 „	60	*Phenyläthylamin*, $^1/_2$ Proz. in Tyrodelösung	1	10	5 cm	0	10	50 „	60			
									25	50 „	60	15	10 „	0
									60	50 „	60	50	25 „	0
									3h 40′	50 „	60	$3^1/_2$ h	27,5 „	0
									6 40	50 „	60	$6^1/_2$	40 „	0
3	21. VIII.	50 „	60	*Phenyläthylamin*, $^1/_2$ Proz. in Tyrodelösung	1	5	12 „	0	5′	50 „	55			
									35	50 „	60	25′	17,5 „	0
									3h 10′	50 „	70	3h	40 „	0
									6 10	50 „	50	6h	43 „	0
4	22. VIII.	50 „	58	*Phenyläthylamin*, $^1/_4$ Proz. in Tyrodelösung	0,5	4	35 „	0						
						13	40 „	0						
						25	35 „	0						
									70′	50 „	60	40′	50 „	35
5	22. VIII.			*Phenyläthylamin*, $^1/_4$ Proz. in Tyrodelösung	2	8	0 „	0						
						22	vollst. Anästhesie							
							22 „	0°						
									65	50 „	60	40	40 „	0
6	22. VIII.	50 „	50	*Phenyläthylamin-HCl*, $^1/_2$ Proz. in Tyrodelösung	2	10	50 „	0						
						30	50 „	5						
						60	50 „	5						
7	22. VIII.	50 „	50	*Phenyläthylamin-HCl*, 1 Proz. in Tyrodelösung. Darauf kam der Nerv in $^1/_4$ proz. Phenyläthylamin in Tyrode	2	5	47 „	0						
						20	50 „	0						
					2	40	0 „	0						

Tabelle I a.

Nr.	Datum	Erregbarkeit des Nerven *vor* der Anästhesie. Minimal wirksamer tetanischer Reiz in Kroneckereinheiten	Präparat und Konzentration desselben	Dauer d. Einwirkung des Anästhetikums auf den Nerv	Erregbarkeit des Nerven *nach* der Anästhesie: Minuten nach der Anästhesie	Erregbarkeit des Nerven *nach* der Anästhesie: Minimal wirksamer tetanischer Reiz in Kroneckereinheiten	Kontrolle. Erregbarkeit des nicht anästhetisierten Nerventeiles: Min. nach Beginn des Versuches	Kontrolle. Erregbarkeit des nicht anästhetisierten Nerventeiles: Minimal wirksamer tetanischer Reiz in Kroneckereinheiten	Erregbarkeit des anästhetis. Nerventeiles nach Hineinbringen desselben in Tyrodelösung: Nach Minuten in Tyrodelösung	Erregbarkeit des anästhetis. Nerventeiles nach Hineinbringen desselben in Tyrodelösung: Minimal wirksamer tetanischer Reiz in Kroneckereinheiten
8	12. II. 1919	5	Phenyläthylamin, 1 Proz. in Tyrodelösung	2′	5	vollst. Anästhesie	5	10		
					15	„ „	15	30		
					30	„ „	30	25		
							$2^1/_2$h	45	$2^1/_2$h	45
9	13. XI. 1918	8	*Cocain hydr.*, 1 proz. in Tyrodelösung	2	10	10	10′	10		
					30	10	30	10		
			Darauf kam der Nerv in *Phenyläthylamin*, 1 Proz. in Tyrodelösung	2	10	800	10	10		
					60	800	60	12		
10	7. II. 1919	5	Phenyläthylamincarbonat, $^1/_2$ Proz. in Tyrodelösung	4	5	vollst. Anästhesie	5	5		
					10	„ „	10	5		
					25	„ „	25	5	10h	noch vollständige Anästhesie
11	10. II. 1919	5	Novocain, 1 Proz.	3	5	„ „	5	7		
					25	„ „	25	7	5h	8 (Erholung)
12	11. II. 1919	5	„ 1 „	1	5	„ „	5	7		
					12	„ „	12	15		
									5h	7 „
13	15. II. 1919	5	„ 1 „	5	5	„ „	5	5		
									$1^1/_4$h	100

Tabelle II.

Narkotische Wirkung des Phenyläthylamins und seiner Salze auf Froschlarven.

Präparat	Konzentration	Wirkung	Bemerkungen
Phenyläthylamin . . .	n/500	Narkose nach 15 Min.	Erholung i. frisch. H_2O nach 1½ Std.
" . . .	n/500	" " 19 "	
" -HCl .	n/500	" " 2½ Std.	
" -Acetat	n/500	Nach 3½ Std. keine Narkose	
" -Oxalat	n/500	" 3½ " " " , " 6 " " "	
" -Tartrat	n/500	Nach 3¾ Std. vorübergeh. Rückenlage, aber keine vollständige Narkose	Sehr rasche Erholung in frischem Wasser
" -Citrat	n/500	dasselbe	
" . . .	n/200	Nach 3′ vollständ. Narkose	
" -Tartrat	n/200	" 2½ Std. keine Narkose	
" -Citrat	n/200	" 2½ " " "	
" -Acetat	n/200	" 2½ " " "	
" -Oxalat	n/200	" 2½ " " " .	
Phenyläthylamin in neutraler Phosphatmisch. (40 ccm m/10 NaH_2PO_4 + 60 ccm m/10 Na_2HPO_4)	n/200	Selbst nach 7 Std. keine Narkose	
Phenyläthylamin in alkalischer Phosphatmisch. (70 ccm m/10 Na_2HPO_4 + 30 ccm m/10 NaH_2PO_4)	n/200	Nach 3 Std. keine Narkose	Reagiert schwach alkalisch
Na_2HPO_4	m/100	19½ Stunden ganz normale Beweglichkeit	
Na_2HPO_4	m/20	15 Stunden ganz normale Beweglichkeit	Reagiert stark alkalisch
Phenyläthylamin . . .	n/500	Nach 3 Min. verminderte Beweglichkeit, vorübergehende Rückenlage, nach 5 Min. vollständige Narkose	
Phenyläthylamin, Zusatz von Cl^- (2 ccm n/10 NaCl)	n/500	Nach 3 Min. beginnende, n. 4 Min. vollständige Narkose	Erholung i. frisch. Wasser nach 1½ Stunden
Phenyläthylamin, Zusatz von HPO_4^{--} (2 ccm n/10 Na_2HPO_4) . . .	n/500	Nach 6 Min. vollständige Narkose	Erholung i. frisch. Wasser nach 1 Std. 20 Min.
Phenyläthylamin, Zusatz von $H_2PO_4^-$ (2 ccm n/10 NaH_2PO_4) . . .	n/500	Nach 22 Min. verminderte Beweglichkeit, vorübergeh. Rückenlage. Nach 35 Min. vollständige Narkose	

C. Versuche mit Gelatinequellung.

Eine abgewogene Menge käuflicher Gelatine wurde für 1 Tag in destilliertes Wasser gebracht und dann unter gelindem Erwärmen in so viel Wasser aufgelöst, daß eine 10proz. Mischung entstand. Nach dem Erstarren wurde die Masse in eine Anzahl Stücke von gleichem Gewicht geschnitten. Jedes Gelatinestück kam in 30 ccm der Quellungsflüssigkeit

und wurde in einem Fläschchen mit zugeschliffenem Stopfen stehengelassen. Der besseren Übersicht halber sind die Resultate in Form einer Tabelle zusammengestellt. Das Phenyläthylamin (als freie Base) begünstigt die Wasseraufnahmefähigkeit der Gelatine sehr stark. Nach 2 Stunden verdoppelt sich das Gewicht des Gelatineblocks, zuletzt tritt eine Verdreifachung des ursprünglichen Gewichtes ein. Zusatz eines Anions zum Phenyläthylamin vermindert seine quellungsbefördernde Wirkung sehr stark; in Phenyläthylamin*hydrochlorid*, *-tartrat*, *-acetat*, *-oxalat* nimmt die Gelatine nur ganz wenig Wasser auf, ungefähr ebensoviel wie beim Aufbewahren in destilliertem Wasser. Die gleiche depressive Wirkung auf die Quellungsfähigkeit findet man auch, wenn man anstatt der oben erwähnten Säuren ihre Salze nimmt. Setzt man der n/10 Phenyläthylaminlösung Na-Acetat oder Na-Citrat oder eine neutral reagierende Puffermischung hinzu, so quillt die Gelatine nur ganz wenig. Für eine spezifische Beeinflussung der Quellung durch das Phenyläthylaminmolekül sprechen auch die Kontrollversuche mit n/10 NaOH und n/10 HCl; die Quellung ist in diesem Falle viel geringer als mit n/10 Phenyläthylamin (vgl. Tabelle III).

Tabelle III.

Wirkung des Phenyläthylamins und seiner Salze auf die Gelatinequellung.

Präparat	Konzentration	Gew. d. Gelatineblocks vor der Quellung i. g	Gewicht des Gelatineblocks nach der Quellung in g				
			nach 2 Std.	nach 17½ Std.	nach 18 Std.	nach 21 Std.	nach 30 Std.
Destilliertes Wasser . . .		5,8	5,94	6,15	—	—	—
Phenyläthylamin	n/10	5,8	9,37	16,81	—	—	—
„ -Citrat .	n/10	5,8	6,60	6,80	—	—	—
Phenyläthylamin in *neutraler Phosphatmischung* (1 Teil NaH_2PO_4 + $1^1/_2$ Teile Na_2HPO_4) . .	n/10	5,8	6,60	7,15	—	—	—
Destilliertes Wasser . . .		5,55	5,66	—	—	—	5,90
Phenyläthylamin	n/10	5,55	9,50	—	—	16,6	16,6
„ *-HCl* . .	n/10	5,55	5,77	—	—	6,25	6,40
„ *-Tartrat* .	n/10	5,55	5,93	—	—	—	6,72
„ *-Acetat* .	n/10	5,55	5,87	—	—	—	6,75
„ *-Oxalat* .	n/10	5,55	5,94	—	—	—	6,70
Phenyläthylamin	n/10	6,3	—	—	16,8	—	—
Destilliertes Wasser . . .		6,3			6,3		
Phenyläthylamin (n/10) in n/10 *Harnstofflösung* . .	n/10	6,3			15,2		
Phenyläthylamin (n/10) in *Na-Citratlösung*	n/10	6,3			8,1		
Phenyläthylamin (n/10) in n/10 *Na-Acetatlösung* .	n/10	6,3			8,45		
Phenyläthylamin (n/10) in n/10 *K-Na-Tartratlösung*	n/10	6,3			7,95		
Phenyläthylamin (n/10) in n/10 *$NaHCO_3$-Lösung* .	n/10	6,3			8,40		
NaOH	n/10	7,05				10,20	
HCl	n/10	7,05				9,75	
Destilliertes Wasser . . .	n/10	7,05				7,28	

Eine große Reihe von Versuchen wurde am *Reflexfrosch nach Türk* ausgeführt. Die Versuche sollen hier nicht näher besprochen werden. Eine etwa 3 Minuten andauernde Bepinselung mit einer 1 proz. Lösung von Phenyläthylamin genügt z. B., um das Froschbein selbst gegen konzentrierte Salzsäure vollkommen unempfindlich zu machen. Verwendet man schwächere Phenyläthylaminlösungen oder begnügt man sich bei der 1 proz. Phenyläthylaminlösung mit einer kürzer dauernden Bepinselung, so erzielt man ebenfalls eine vollständige Reflexlosigkeit oder eine sehr starke Verlängerung der Reflexzeit.

Der Einfluß des Phenyläthylamins auf die *Geschmacksempfindung der Zunge* geht aus folgendem Versuche hervor: die Zunge wurde 4 Minuten lang mit einer ½ proz. Lösung von Phenyläthylamin bepinselt. Insgesamt wurde für diese Bepinselung 0,015 g Phenyläthylamin verbraucht. Der Erfolg ist aus nachfolgender Zusammenstellung ersichtlich:

Nach Minuten	20 Proz. Zucker	NaCl 10 Proz.	Chinin 2 Proz.	Weinsäure 2 Proz.
3	—	—	—	—
10	—	—	—	—
20	—	—	—	?
35	—	—	—	schwach
45	—	—	—	+
55	schwach	+	schwach	+
70	"	+	"	+
90	+	+	"	+

Das *salzsaure* Phenyläthylamin wirkt auch auf die Zungenschleimhaut schwächer als die freie Base. Die Geschmacksempfindung für süß, salzig, sauer und bitter wird zwar auch durch eine 1 proz. Lösung von Phenyläthylamin-HCl aufgehoben, sie kehrt aber nach 10 bis 15 Minuten zurück.

Zusammenfassung.

1. *Phenyläthylamin* besitzt starke lokalanästhetische Eigenschaften und wirkt selbst in schwacher Konzentration (m/500 bis m/200) narkotisch auf Froschlarven. Der Eintritt einer paraständigen Hydroxylgruppe in das Molekül und somit die Überführung des Phenyläthylamins in das Tyramin ist von einer beinahe vollständigen Aufhebung der lokalanästhetischen und narkotischen Wirkungen begleitet. *Hordenin* (w-Dimethyl-tyramin) wirkt dagegen auf Kaulquappen schwach narkotisch.

2. Die Wirksamkeit des Phenyläthylamins und vieler seiner Derivate ist in weitgehendem Maße von der Wasserstoffionenkonzentration der Lösung abhängig: eine saure Reaktion oder selbst ein $p_H = 7,0$ bis $7,5$ hemmt die narkotischen und lokalanästhetischen Wirkungen. Bei $p_H = 8,4$ bis $8,5$ wirken dagegen auch ganz verdünnte Phenyläthylaminlösungen sehr stark. Ebenso wie die narkotische wird auch die quellungsfördernde Wirkung des Phenyläthylamins durch eine neutrale oder schwach saure Reaktion stark abgeschwächt oder fast ganz aufgehoben.

Über Blutkatalase.

Von

W. v. Moraczewski.

(Aus der medizinischen Universitätsklinik in Lemberg.)

(Eingegangen am 25. Juli 1923.)

Der Katalase des Blutes wurde durch die Untersuchung von *van Thienen* eine Bedeutung bei der Diagnose der Schwere einer Anämie zugeschrieben. Dieser Forscher gab an, daß ähnlich wie der Blutfarbenindex die Katalase des Blutes bei schweren Anämien relativ vermehrt erscheint.

Es unterliegt keinem Zweifel, daß die Zahl der roten Blutzellen das Maßgebende der katalytischen Eigenschaft des Blutes ist. Die Menge des zersetzten Wasserstoffsuperoxyds ist in erster Linie von der Zahl der roten Blutzellen abhängig, und bei einer Zahl der Erythrocyten, welche 1000000 beträgt, finden wir durchschnittlich 23 bis 60 ccm $^1/_{100}$ Kaliumpermanganat, entsprechend dem zersetzten H_2O_2, bei der Polycythemie mit 8000000 Erythrocyten 230 bis 300 ccm.

Wenn man nun die Zahl der verbrauchten Kubikzentimeter der Permanganatlösung mit der Zahl der Erythrocyten in Beziehung bringt, wie es *van Thienen* machte, so ergibt sich im großen und ganzen, daß bei geringer Blutzellenzahl relativ höhere Zahlen gefunden werden als bei normalen oder übernormalen Erythrocytenmengen. Dieses sieht man an folgenden Beispielen (Tabelle I).

Tabelle I.

Zahl der Erythrocyten . . .	1000000—3000000
Zahl der ccm $KMnO_4$ $^1/_{100}$.	28—130
Index	5—10
Zahl der Erythrocyten . . .	3000000—5000000
Zahl der ccm $KMnO_4$ $^1/_{100}$.	76—200
Index	5—8
Zahl der Erythrocyten . . .	5000000—8000000 und darüber
Zahl der ccm $KMnO_4$ $^1/_{100}$.	96—300
Index	5—6

Durchschnittszahlen von etwa 60 bis 70 Beobachtungen.

Wenn nun sowohl von uns wie von anderen die hohen Indexzahlen und die Regelmäßigkeit dieser Indexerhöhung nicht gefunden wurde, so liegt es vielleicht an besonderen Umständen der Untersuchung.

Es interessierte uns an der Frage eher die Beziehung der katalytischen Eigenschaften des Blutes zu den krankhaften Zuständen des Organismus und zu den Veränderungen, welche durch das Fieber und

die Medikamente gesetzt werden — und über diesbezügliche Versuche soll hier berichtet werden.

Wenn man bei einem Fiebernden fortlaufende Bestimmungen der Katalase durchführt, so ist es leicht zu entdecken, daß die Katalase mit der Dauer des Fiebers fällt. Es zeigen dieses folgende Beispiele, welche von den vielen Beobachtungen gewählt sind (Tabelle II).

Tabelle II.

	5. XII.	7. XII.	9. XII.	11. XII.	13. XII.	15. XII.
Typhus abdominalis. Zahl der ccm von $KMnO_4$ $^1/_{100}$	184	174	160	140	120	90
Typhus abdominalis . . .	173	114		108		98
Sepsis	196	165		156		
Pneumonie	219	184	173	172		176 nach der Krise
Temperatur	39°	39°	38	36°		36°
Pneumonie	188	157	144			
Malaria	144	130	120			
„	93	70	80 nach Genesung			

Ebenso verhält sich die Katalase bei künstlich erzeugtem Fieber bei Proteinkörperbehandlung, in unserem Falle bei Milchinjektionen (Tabelle III).

Tabelle III.

Milchinjektion.

I. *K.* ccm $^1/_{100}$ $KMnO_4$	187	Leucocyten	2700
Nach der Milchinjektion	168	„	2900
„ „ „	162	„	3000
II. *S.* ccm $^1/_{100}$ $KMnO_4$	184	„	5600
„ $^1/_{100}$ $KMnO_4$	176	„	4600
„ $^1/_{100}$ $KMnO_4$	174	„	4800
Nach 2 Tagen.			
ccm $^1/_{100}$ $KMnO_4$	164	Leucocyten	4400
„ $^1/_{100}$ $KMnO_4$	160	„	5600
„ $^1/_{100}$ $KMnO_4$	152	„	3800
III. *Tr.* „ $^1/_{100}$ $KMnO_4$	175	„	6000
„ $^1/_{100}$ $KMnO_4$	145	„	6200
„ $^1/_{100}$ $KMnO_4$	149	„	5800

Man ersieht aus diesen Beispielen, daß die Katalase sowohl beim Sinken der Leucocytenzahl wie bei ihrer Erhöhung stets in gleichem Sinne reagiert, nämlich immer eine Verminderung zeigt.

Auch der Genuß von Eiweiß nach einer längeren Fieberperiode bewirkt ein Sinken der Katalase gleichzeitig mit Erhöhung der Temperatur, ein Prozeß, welchen wir bei Rekonvaleszenten nach Typhus beobachtet haben, wenn sie zum erstenmal nach der Abfieberung ein Ei genossen haben. Diese Fieberreaktion ist übrigens mit der Leucocytenvermehrung verbunden und kann mit dem *Widal*schen hämoklastischen Schock verglichen werden.

Nach diesem Schock sowie nach Milchgenuß bei Leberinsuffizienz sehen wir die Katalase sinken (Tabelle IV).

Tabelle IV.

Nach Eiweißgenuß.

Ek.	ccm $^1/_{100}$ $KMnO_4$	164	Leucocyten	5500
	Nach Eiweiß	155	„	8200
	„ „	158	„	7200
Sz.	ccm $^1/_{100}$ $KMnO_4$	126	„	5800
	Nach Genuß von einem Ei	102	„	8500
	„ „ „ „ „	123	„	6400
Po.	ccm $^1/_{100}$ $KMnO_4$	157	„	8400
	Nach 200 ccm Milch . . .	151	„	6400
	(Leberinsuffizienz)	176	„	10000

Es war von Interesse zu untersuchen, ob auch ein Steigen zu beobachten wäre, wenn wir den Ernährungszustand des Organismus heben.

Wir untersuchten nun die Katalase bei Zuckerzufuhr und Zuckermobilisation und fanden, daß alle die Eingriffe, welche zur Mobilisation des Zuckers führen oder die Ernährung des Organismus steigern, mit einer Vermehrung der Katalase des Blutes einhergehen, ohne daß dabei die Zahl der Erythrocyten vermehrt wird. Diese Vergrößerung der katalytischen Kraft des Blutes ist gering und nicht zu vergleichen mit jener, welche wir bei Blutverlusten antreffen, oder bei Individuen, welche sich durch die Zahl der roten Blutzellen bedeutend unterscheiden. Diese Vermehrung der Katalase ist auch nicht etwa durch den Blutzucker verursacht, denn ein Zusatz von Zucker zum Blute in vitro übt so gut wie keinen Einfluß auf das katalytische Vermögen, besonders n den Mengen, welche hier in Frage kommen. Es ist dies also eine Katalasenvermehrung besonderer Art, eine Vermehrung, welche, wenn auch gering, denn doch so deutlich und eindeutig war, daß sie keinem Zweifel unterliegen darf (Tabelle V).

Tabelle V.

Zuckervermehrung.

Z.	Diabetes mellitas.			
	ccm $^1/_{100}$ $KMnO_4$	135	Gemischte Kost	
	„ $^1/_{100}$ $KMnO_4$	91	Gemüsetag	
	„ $^1/_{100}$ $KMnO_4$	119	Haferdiät	
	„ $^1/_{100}$ $KMnO_4$	81	Hungertag	
Hr.	Tbc. nach Fettgenuß	136	ccm $KMnO_4$ (nüchtern	146)
	„ Eiweiß	144	„ $KMnO_4$ („	142)
	„ Zucker	149	„ $KMnO_4$ („	143)
L.	„ Phlorhidzininjektion . . .	62	„ , vor der Injektion	56
H.	„ „	94	„ , „ „ „	88
P.	„ Zucker intravenös	136	„ , „ „ „	128
M.	„ Adrenalin	204	„ , „ „ „	174
F.	„ „	163	„ , „ „ „	151
D.	„ Pilocarpin	89	„ , „ „ „	94
K.	„ „	109	„ , „ „ „	114

Phlorhidzin erzeugt bekanntlich eine Verminderung des Blutzuckers, trotzdem finden wir nach Phlorhidzin eine Vermehrung der katalytischen Kraft. Pilocarpin soll ebenfalls nach meinen früheren Versuchen eine Verminderung des Blutzuckers bewirken, und wir finden hier ein Sinken der Katalase. Adrenalin bewirkt eine Vermehrung, ebenso die Zuckerinjektion.

Einen ganz besonderen Einfluß übten die Strychnininjektionen, welche wir bei Herzkranken machten. Es zeigte sich nämlich bei zahlreichen Versuchen, daß diese Injektion verschieden auf die Katalase wirkt, je nach dem Zustande des Organismus. Nur bei geschwächtem Organismus bewirken sie eine regelmäßige und deutliche Depression des katalytischen Vermögens. Nicht aber bei gesunden oder solchen, welche Zirkulation und Atmungsorgane unbeschädigt haben, z. B. Tabelle VI.

Tabelle VI.

D.	Appendicitis	vor d. Injekt.	189	nach d. Injekt.	189 ccm	$KMnO_4$
B.	Ectasia ventriculi .	" " "	197	" " "	197 "	$KMnO_4$
J.	Myocarditis	" " "	192	" " "	174 "	$KMnO_4$
H.	Insuffizienz aortae .	" " "	157	" " "	142 "	$KMnO_4$
D.	Rekonvaleszent n. Ty.	" " "	157	" " "	144 "	$KMnO_4$
C.	Polycythemie Astm.	" " "	234	" " "	212 "	$KMnO_4$
K.	Insuffizienz aortae .	" " "	187	" " "	151 "	$KMnO_4$

Diese Verminderung der katalytischen Kraft konnte zwar durch Schädigung der Leber erklärt werden, nur ist es unbegreiflich, warum die Herzinsuffizienz dabei maßgebend sein sollte. Daß diese Depression des katalytischen Vermögens nicht durch Herzexzitantien bewirkt werden kann, haben wir uns überzeugen können, indem wir dieselben Kranken durch Coffeininjektionen behandelten und dabei eher ein Steigen der Katalase, nie aber ein Sinken verzeichneten, z. B.:

G. Endocarditis	Coffeininjektion	vor der Inj. 70	nach der Inj.	71
G. "	Strychnininjektion	" " " 70	" " "	64
W. Asthma . .	Coffeininjektion	" " " 162	" " "	177
W. " . . .	Strychnininjektion	" " " 247	" " "	288

Ebenso übt eine Sauerstoffinhalation eine Erhöhung, nicht ein Sinken der Katalase, und eine Atropin- oder Morphiuminjektion ist überhaupt ohne Wirkung auf den Gehalt an Katalase.

Im großen und ganzen haben wir also die Beobachtung von *van Thienen* bestätigen können, dahin lautend, daß das erythrocytenarme Blut relativ mehr Katalase besitzt als das erythrocytenreiche.

Daneben fanden wir einen deutlichen Einfluß des Fiebers und der Infektion, welche das katalytische Vermögen des Blutes deutlich herabsetzen, und konnten einen entgegengesetzten Einfluß, d. h. eine Vermehrung der Katalase bei reichlicher Ernährung feststellen. Dabei ist wohl nicht die Zuckervermehrung des Blutes allein maßgebend.

Endlich fanden wir eine Verminderung der Blutkatalase nach Strychnininjektion, welche besonders deutlich bei Herzkranken, Asthmatikern und Rekonvaleszenten zu sehen war und bei Herzgesunden nicht auftrat.

Literatur.

1) *G. J. van Thienen*, Deutsch. Arch. f. klin. Med. **181**, 113. — 2) *Strauß*, Münch. med. Wochenschr. Nr. 34, 1921. — 3) *Rudolf Niessen*, Zeitschr. f. klin. Med. **92**, 1. — 4) *H. Strauss* und *G. Rammelt*, diese Zeitschr. **122**, 137. — 5) *W. E. Burge*, Amer. Journ. of Phys. 1918. — 6) *W. E. Burge* und *A. J. Neill*, ebendaselbst 1918. — 7) *R. J. Neymur*, ebendaselbst 1920. — 8) *H. Korallus*, Deutsch. Arch. f. klin. Med. **189**, 252. 1922. — 9) *E. Bach* und *W. Lewinger*, Zeitschr. f. klin. Med. **95**, 88.

Die Bestimmung des Fibrinogens im Blutplasma.

Von

St. Rusznyák und **I. Barát.**

(Aus der III. medizinischen Klinik der Universität in Budapest.)

(Eingegangen am 25. Juli 1923.)

Die Kenntnis des Fibrinogengehaltes des Blutes gewinnt in der letzten Zeit ständig an Wichtigkeit. Um so mehr benötigen wir eine Methodik, welche einfach, rasch und an kleinen Substanzmengen arbeitend, Serienuntersuchungen gestattet. Bisher kommen hauptsächlich drei Methoden in Betracht.

1. Die Methode von *Reye* (1) fällt das Fibrinogen durch Sättigung zu 27 Proz. mit Ammonsulfat und bestimmt deren Menge *gravimetrisch*. Die Methode benötigt größere Substanzmengen und ist viel zu umständlich, um für klinische Zwecke brauchbar zu sein. 2. Die Methode von *Howe* (2) fällt das Fibrinogen mit Calciumchlorid und bestimmt die Niederschlagsmenge durch eine *Stickstoffbestimmung* nach *Folin*. Diese Methode hat sicher Vorteile vor der gravimetrischen, doch ist die Stickstoffbestimmung bei Serienuntersuchungen noch immer viel zu beschwerlich. 3. Am einfachsten und verbreitetsten ist die *refraktometrische* Methode von *Winternitz* (3). Sie entspricht tatsächlich den Forderungen der klinischen Arbeit, was Raschheit und die Verwendung von kleinen Substanzmengen betrifft, doch bestehen starke Bedenken theoretischer Natur gegen ihre Richtigkeit. Ganz abgesehen davon, daß die refraktometrische Eiweißbestimmung in gewissen Fällen versagt (Lipämie, stark erhöhter Reststickstoffgehalt), kann man das Serum nicht einfach als Plasma minus Fibrinogen betrachten. Bei der Gerinnung des Blutes entstehen Salz- und Wasserverschiebungen, wie das jüngst auch *Leendertz* (4) hervorgehoben hat, welche die refraktometrische Methode nicht berücksichtigt. Diese Umstände berücksichtigend, haben in jüngster Zeit *Leendertz* und *Gromelski* (5) das ursprüngliche *Winternitz*sche Verfahren derart modifiziert, daß es nunmehr einwandfrei erscheint.

Der eine von uns hat vor einiger Zeit eine nephelometrische Methode zur Bestimmung des Albumin-Globulinquotienten angegeben (6) und schon damals die Ansicht geäußert, daß dasselbe Prinzip auch für eine Fibrinogenbestimmung anwendbar wäre. Wir haben nun die

Methode auch zu diesem Zwecke ausgearbeitet. Nach einigen Vorversuchen hat sich folgendes Verfahren als empfehlenswert erwiesen.

0,10 ccm Citratplasma werden in einem Kolben mit 50 ccm einer sauren Ammonsulfatlösung (1 Teil n/5 Salzsäure + 1 Teil konzentrierte Ammonsulfatlösung) versetzt. Wie aus früheren Untersuchungen schon bekannt war, fällt dabei das gesamte Eiweiß in Form einer feinen, nur sehr langsam ausflockenden Trübung aus. In einem anderen Kolben werden 0,40 ccm desselben Plasmas mit 25 ccm einer zu 27 Proz. konzentrierten Ammonsulfatlösung (27 ccm konzentrierte Ammonsulfatlösung + 73 ccm destilliertes Wasser) vermischt; die hierbei entstehende, oft kaum sichtbare Trübung besteht ausschließlich aus Fibrinogen. (War das Plasma schon an sich trüb, was bei der Blutentnahme auf nüchternen Magen sehr selten ist, so muß ein drittes Gefäß mit 0,40 ccm Plasma und 25 ccm physiologischer Kochsalzlösung eingestellt werden und ist als „Eigentrübung" nephelometrisch zu bestimmen und aus den Eiweißwerten abzuziehen.) Der Trübungsgrad der Lösungen wird nun wie bei der Bestimmung des Albumin-Globulinquotienten gegenseitig nephelometrisch verglichen. Bei der Berechnung muß berücksichtigt werden, daß die Verdünnung bei dem Gesamteiweiß 7,9mal so groß ist als bei der Fibrinogenfällung, so daß die Fenstergröße der Fibrinogenseite mit dieser Zahl multipliziert werden muß.

Zur Ausführung der Methode genügen 0,5 ccm Plasma, die ganze Bestimmung und Berechnung kann in 10 Minuten ausgeführt werden.

Wir haben die Methode des öfteren gravimetrisch kontrolliert und gut übereinstimmende Werte gefunden.

	Gesamteiweiß/Fibrinogen	
	nephelometrisch	gravimetrisch
Fall 1	43,1	45,6
Fall 2	26,3	22,4
Fall 3	15,3	15,6
Fall 4	21,3	18,7

Die Übereinstimmung ist allerdings nicht so schön, wie bei der Bestimmung des Albumin-Globulinquotienten, doch müssen wir bedenken, daß bei der relativ kleinen Menge des Fibrinogens auch die gravimetrische Methode (wir benutzten dazu je 10 ccm Plasma) mit einem Fehler von etwa 10 Proz. arbeitet.

Die mit der Methode erhaltenen Werte bedeuten natürlich nur die relative Menge des Fibrinogens im Verhältnis zum Gesamteiweißgehalt, doch braucht man auch in Serienuntersuchungen nur eine einzige quantitative Gesamteiweißbestimmung vorzunehmen (gravimetrisch, refraktometrisch oder Stickstoffbestimmung), und man kann dann sämtliche Werte auf absolute umrechnen.

Zusammenfassung.

Es wird eine nephelometrische Methode zur quantitativen Bestimmung des Fibrinogens im Plasma angegeben.

Literatur.

1) *Reye*, zit. nach *Neuberg*, Der Harn **2**, 983. — 2) *Howe*, Journ. of biol. Chem. **49**, 109. — 3) *Winternitz*, Arch. f. Dermat. u. Syph. Orig. **100**, 1910. — 4) *Leendertz*, Deutsch. Arch. f. klin. Med. **140**, 279. — 5) *Leendertz* und *Gromelski*, Arch. f. exper. Path. u Pharm. **94**, 114. — 6) *Rusznyák*, diese Zeitschr. **188**. 370.

Eine Mikromethode zur quantitativen Bestimmung der Eiweißfraktionen im Plasma.

Von

Stefan Rusznyák.

(Aus der III. medizinischen Klinik der Universität in Budapest.)

(Eingegangen am 25. Juli 1923.)

Die chemische Analyse des Blutes erreichte ihre heutige klinische Bedeutung erst dann, als, hauptsächlich unter der Anregung der Arbeiten von *Bang*, Mikromethoden ausgearbeitet worden sind. Die älteren Methoden mit ihrem großen Aufwand an Zeit und Material waren für die klinische Praxis ungeeignet. Daß es hierbei tatsächlich nur auf die Methodik ankommt, läßt sich am besten am Beispiel der Bluteiweißkörper zeigen. Während die verschiedensten Blutbestandteile, Zucker, Chloride, Bilirubin usw. in einer ganzen Flut von Arbeiten unter den verschiedensten Verhältnissen untersucht worden sind, blieben die so wichtigen Eiweißkörper viel zu vernachlässigt. Man beschäftigte sich ja von Zeit zu Zeit mit dem Albumin-Globulinquotienten, und in jüngster Zeit wendet sich das Interesse in erhöhtem Maße dem Fibrinogen zu, doch fehlte bisher eine Methode, welche, den klinischen Bedürfnissen entsprechend, eine rasche quantitative Bestimmung der Eiweißfraktionen des Blutplasmas in kleinen Blutmengen gestatten würde. Es ist zwar von *Howe* (1) vor einiger Zeit eine Methode angegeben worden, welche die Bestimmung der einzelnen Fraktionen in relativ wenig Plasma ermöglicht, doch ist sein Verfahren für ausgedehntere Untersuchungen noch immer viel zu umständlich.

Das vor einiger Zeit von uns ausgearbeitete Verfahren zur Bestimmung des Albumin-Globulinquotienten (2) und des Fibrinogengehaltes (3) mit Hilfe der Nephelometrie führte zu dem Gedanken, diese einfache Methode auch für die quantitative Bestimmung von sämtlichen Fraktionen auszuarbeiten. Wir gingen von der seit *Hofmeister* bekannten Tatsache aus, daß durch eine zu 27 Proz. konzentrierte Ammonsulfatlösung das Fibrinogen, durch eine zu einem Drittel konzentrierte Lösung Fibrinogen und Euglobulin, und durch eine

halbgesättigte Lösung das Fibrinogen, Euglobulin und Pseudoglobulin ausgefällt werden. Allerdings wurde die Trennung des Euglobulins vom Pseudoglobulin mit Hilfe von Aussalzungsmethoden von mehreren Forschern beanstandet, da zwischen den einzelnen Fraktionen fließende Übergänge bestehen, wie das auch jüngst *Oeller* und *Schierge* (4) richtig betonen. Auch aus der schönen Arbeit von *Mellanby* (5) ergibt sich, daß, wenn man Serum mit verschieden konzentrierten Salzlösungen fällt, die Menge des gefällten Eiweißes eine stetige Kurve bildet, welche keine Sprünge aufweist, aus welchen man auf prinzipielle Unterschiede der einzelnen Fraktionen schließen könnte. Wenn wir noch erwähnen, daß unter den verschiedensten Umständen die einzelnen Eiweißkörper ineinander übergehen können, so ist leicht einzusehen, daß eine scharfe Trennung dieser Stoffe überhaupt nicht möglich ist, und die Bezeichnungen Albumin, Globulin usw. lediglich konventioneller Natur sind. Dies vor Augen haltend, wollen wir, dem alten Übereinkommen gemäß, jene Eiweißkörper, welche auf Halbsättigung mit Ammonsulfat ausfallen, Globuline, und die, welche hierbei in Lösung bleiben, Albumine nennen; die weitere Fraktionierung in Fibrinogen, Euglobulin und Pseudoglobulin wollen wir auf die oben angegebene Weise vornehmen. Die Pseudoglobulinfraktion läßt sich bekanntlich weiter noch in eine Fraktion I und II zerlegen, wenn man noch eine zu 40 Proz. konzentrierte Ammonsulfatlösung verwendet. Will man die Fraktionierung nicht mit Ammonsulfat, sondern mit Natriumsulfat vornehmen, wie das z. B. *Howe* empfiehlt, so kann das mit geringen Änderungen prinzipiell auf dieselbe Weise geschehen; wir haben die Ammonsulfatmethode benutzt und haben mit Natriumsulfat noch sehr wenig Erfahrung.

Die Methode.

Aus früheren Untersuchungen war uns bekannt, daß die nephelometrisch bestimmte Niederschlagsmenge bei der Fällung von Serum oder Plasma mit einer zu 50 Proz. oder zu 27 Proz. konzentrierten Ammonsulfatlösung gut mit der gravimetrischen Bestimmung übereinstimmt; daraus folgerten wir, daß diese Übereinstimmung auch bei den dazwischen liegenden Konzentrationen besteht. Auf dieser Grundlage haben wir nach einigen Vorversuchen folgende Methode ausgearbeitet.

Vier *Erlenmeyer*sche Kolben werden mit I, II, III und IV bezeichnet.

In Kolben I werden 0,10 ccm Plasma (Citratplasma, bereitet mit einer 5proz. Natriumcitratlösung 1:4 Blut) abgemessen und mit 50 ccm einer sauren Ammonsulfatlösung verdünnt (1 Teil n/5 Salzsäure + 1 Teil konzentrierte Ammonsulfatlösung).

Im Kolben II werden 0,10 ccm Plasma mit 25 ccm einer halbgesättigten Ammonsulfatlösung verdünnt.

In Kolben III werden 0,40 ccm Plasma abgemessen und 25 ccm einer zu 33 Proz. konzentrierten Ammonsulfatlösung (1 Teil konzentrierte Ammonsulfatlösung + 2 Teile Aqua dest.) zugesetzt.

Im Kolben IV werden, wie bei der Fibrinogenbestimmung, zu 0,40 ccm Plasma 25 ccm einer zu 27 Proz. konzentrierten Salzlösung (27 ccm konzentrierte Ammonsulfatlösung + 73 ccm Aqua dest.) zugefügt.

Will man auch noch Pseudoglobulin I und II bestimmen, so stellt man noch einen fünften Kolben mit 0,10 ccm Plasma und einer zu 40 Proz. konzentrierten Ammonsulfatlösung ein.

Im Kolben I ist nunmehr das Gesamteiweiß, im Kolben II sämtliche Globuline und das Fibrinogen, im Kolben III Euglobulin + Fibrinogen und im Kolben IV nur das Fibrinogen gefällt. Die entstandenen Trübungen werden nunmehr im Nephelometer miteinander verglichen, wobei die Lösung aus Kolben I (Gesamteiweiß) als Standardlösung dient. Die Berechnung der Resultate läßt sich am besten an einem Beispiele erklären.

Prot. Nr. XXXV; Fall *J. M.*, Vitium cordis. Untersucht am 22. März 1923.

Der Lösung aus Kolben II entsprechen bei 20 mm Fensterlänge 15,1 mm von Lösung I. Die Konzentration von I ist also größer als jene von II, und zwar ist das Verhältnis von I zu II gleich 20:15,1 = 1,32. Wir müssen uns jedoch erinnern, daß die Verdünnung in I doppelt so groß ist als in II, somit ist das Verhältnis von Gesamteiweiß zu Globulin + Fibrinogen gleich 2,64, oder mit anderen Worten Globulin + Fibrinogen entsprechen 37,8 des Gesamteiweißes.

Lösung III entsprechen bei 30 mm Fensterlänge 13,7 mm von Lösung I. Das Verhältnis I:III ist also 2,18; diese Zahl muß jedoch wegen des Unterschiedes in der Verdünnung (I = 0,1 + 50 ccm, III = 0,4 + 25 ccm) mit 7,9 multipliziert werden, so erhalten wir für das Verhältnis von Gesamteiweiß zu Euglobulin + Fibrinogen 17,2, d. h. Euglobulin + Fibrinogen machen 5,8 Proz. des Gesamteiweißes aus.

Lösung IV entspricht bei 30 mm Fensterlänge 10,7 mm von Lösung I, I:IV ist also gleich 2,80, welches ebenfalls mit 7,9 multipliziert 22,1 ergibt (Gesamteiweiß: Fibrinogen). Das Gesamteiweiß besteht also zu 4,5 Proz. aus Fibrinogen.

Bezeichnen wir nun die Menge des Gesamteiweißes mit 100, so sind nach dem bisher Gesagten

Fibrinogen = 4,5
Euglobulin + Fibrinogen = 5,8
Pseudoglobulin + Euglobulin + Fibrinogen = 37,8

Durch einfache Substraktionen erhalten wir daraus:

Fibrinogen	= 4,5	
Euglobulin	= 1,3	
Pseudoglobulin	= 32,0	
Gesamtglobulin	= 33,3	
Albumin	= 62,2	(Gesamteiweiß minus Globulin und Fibrinogen).

Die obigen Zahlen sind natürlich nur relative, sie bedeuten die Mengen der einzelnen Fraktionen in Prozenten des Gesamteiweißes. Ist der Gesamteiweißgehalt des Plasmas bekannt (Refraktometrie, Stickstoffbestimmung usw.), so lassen sich mit Leichtigkeit auch die absoluten Werte berechnen. In unserem Falle war der Eiweißgehalt des Plasmas 7,1 Proz., woraus sich die folgenden absoluten Werte der einzelnen Fraktionen ergeben:

Fibrinogen	0,32 g	in	100 g	Plasma
Euglobulin	0,09 g	,,	100 g	,,
Pseudoglobulin	2,27 g	,,	100 g	,,
Gesamtglobulin	2,36 g	,,	100 g	,,
Albumin	4,42 g	,,	100 g	,,

Diese Zahlen beziehen sich natürlich auf das Citratplasma; wollte man die Werte im zirkulierenden Blute wissen, so müßte man die Verdünnung des Blutes durch die Citratlösung berücksichtigen, wobei, wie *Leendertz* (6) und *Gromelski* hervorgehoben, auch das relative Volum der roten Blutkörperchen eine Rolle spielt.

Das ganze Verfahren, Fällung, Nephelometrie und Berechnung, dauert ungefähr 15 bis 20 Minuten und benötigt 1 ccm Plasma; diese Vorteile machen das Verfahren für klinische und tierexperimentelle Untersuchungen besonders geeignet. Die Notwendigkeit der Verwendung eines Nephelometers ist allerdings ein Nachteil, doch sind auch für andere tägliche klinische Untersuchungen Instrumente wie Refraktometer, Polarimeter usw. nötig, und die Anschaffung eines Nephelometers lohnt sich angesichts der schon jetzt zahlreichen Verwendungsmöglichkeiten (Fettbestimmung, Phosphate, Aceton usw.), deren Zahl voraussichtlich noch beträchtlich zunehmen wird. Für Laboratorien, die im Besitze eines Chromophotometers von *Plesch* sind, sei deren Umwandlung in einen Nephelometer empfohlen (7).

Wie bei jeder neuen Methode, eröffnet sich auch hier eine ganze Reihe von Fragestellungen, welche mit dem neuen Verfahren einer Lösung zugeführt werden können. Es werden zunächst ausgedehnte Untersuchungen nötig sein, um die physiologische Schwankungsbreite der einzelnen Eiweißfraktionen im Plasma festzustellen, dann kommen die Veränderungen unter pathologischen Zuständen an die Reihe. Auch der Zusammenhang der sogenannten Kolloidlabilitätsreaktionen, Blutkörperchensenkung usw. mit der Menge der einzelnen Fraktionen ist zu untersuchen und noch viele andere Fragen der Pathologie. Ähnliche Untersuchungen sind schon derzeit von uns in Angriff genommen worden, und wir behalten uns vor, über ihre Ergebnisse seinerzeit zu berichten.

Zusammenfassung.

Es wird eine einfache und schnelle Mikromethode angegeben, mit welcher die Eiweißfraktionen des Blutplasmas auf nephelometrischem Wege bestimmt werden können.

Literatur.

1) *Howe*, Journ. of biol. Chem. **49**, 1, 109. — 2) *Rusznyák*, diese Zeitschr. **183**, 4—6, 370. — 3) *Rusznyák* und *Barát*, dieses Heft, S. 476. — 4) *Oeller* und *Schierge*, Zeitschr. f. Immunforsch. **36**, 1, 59, 1923. — 5) *Mellanby*, Journ. of physiol. **36**, 288. — 6) *Leendertz* und *Gromelski*, Arch. f. exper. Path. u. Pharm. **94**; **95**. — 7) *Rusznyák*, diese Zeitschr. **183**, 4—6, 365.

Über das Antipepsin.

Von

Ernst Stolz.

(Aus der II. medizinischen Universitätsklinik in Wien.)

(Eingegangen am 27. Juli 1923.)

Als erster fand im Jahre 1901 *Danilewsky*[1]) sowohl in der Epithelschicht des Magens, wie auch im Schleim der Magenwand eine Substanz, die die eiweißverdauende Wirkung des Pepsins in saurer Lösung hemmte. Da diese Substanz ihre Wirksamkeit auch nach kurz dauerndem Kochen beibehielt, konnte es sich nicht um ein Ferment handeln. Ungefähr zur selben Zeit konstatierte auch *Weinland*[2]) ein die Wirkung des Pepsins hemmendes Ferment in der Magenschleimhaut, und basierte auf diesem Befunde seine bekannte Theorie von der Ulcusentstehung im Magen. *Schwarz*[3]) dagegen berichtete, daß auch die Extrakte sämtlicher Organe so ziemlich dieselbe pepsinverdauungshemmende Wirkung auslösten, wie die Extrakte des Magens.

Zahlreiche andere Autoren [*Oppenheimer*[4])] fanden übereinstimmend, daß auch das Serum des Blutes eine Substanz enthält, die imstande ist, die Eiweißverdauung des Pepsins zu hemmen und deshalb Antipepsin genannt wurde. Zum Nachweis dieses Antiferments wurde hauptsächlich die Methode *Oguros*[5]) benutzt, die ich, da ich später auf die Technik dieser Methode hinweisen muß, hier kurz erwähnen will:

Zu einer Reihe von Ragenzgläsern, welche mit je 0,4 ccm einer 1prom. Pepsinlösung[6]) beschickt sind, werden von 0,1 bis auf 1 ccm steigende Mengen

---

[1]) Arbeiten d. 11. Kongr. russ. Naturf. u. Ärzte, zit. nach *Lieblein*, Grenzgeb. 25.

[2]) Über Antifermente, Zeitschr. f. Biol., N. F., **26**, 1 u. 45, 1903.

[3]) Hofmeisters Beitr. **6**, 524, 1905.

[4]) *Oppenheimer*, Die Fermente. Verlag Vogel, 1920.

[5]) Diese Zeitschr. **22**, 266, 1909.

[6]) Die mir zur Verfügung gestandene Pepsinlösung zeigte einen bedeutend geringeren Abbauwert, als in den Arbeiten *Oguros* verzeichnet ist. Ich war infolgedessen genötigt, Pepsinlösungen bis 5:200 herzustellen, um im Kontrollröhrchen innerhalb von 4 Stunden deutlichen Abbau zu erzielen.

des zehnfach verdünnten zu untersuchenden Serums hinzugefügt und in jede Eprouvette diese Flüssigkeit mit physiologischer Kochsalzlösung auf 2,4 ccm aufgefüllt und eine halbe Stunde lang bei einer Temperatur von etwa 37°C im Brutschrank belassen. Dann fügt man zu dieser Lösung 0,5 ccm einer n/10 Salzsäurelösung hinzu und gibt in jede Eprouvette ein etwa bohnengroßes Stück Carminfibrin (*Grübler*) oder 2 ccm einer Ricinlösung 1:500 und liest nach jeder Stunde entweder an der beginnenden Rotfärbung der Flüssigkeit, wenn man Carminfibrin als Indikator genommen hat, oder an der Aufhellung der Trübung bei Verwendung von Ricinlösung, den Grad der Verdauung des Fibrins bzw. Ricins ab. Mit dieser Methode wurde von den oben erwähnten Autoren der Antipepsingehalt des Serums bei verschiedenen Erkrankungen untersucht und insbesondere von *Lieblein*[1]) und *Oguro*[2]) zusammenfassend folgendes festgestellt: Bei chronischer Nephoritis Verringerung des Antipepsingehaltes im Blutserum, doch bei normalen Fällen und auch bei den verschiedensten Erkrankungen, wie Entzündungen jeglicher Art, Carcinomen, Cirrhosen, Vitien, Tabes, Gravidität, Hernien, Obstipationen usw. konstante Antipepsinwerte im Blute, während nur das Ulcus ventriculi verschiedene Werte zeigte. *Lieblein* glaubte deshalb, daß diese Verschiedenheiten der Antipepsinwerte als Antifermente (analog den Antitoxinen) mit den Veränderungen der Pepsinausscheidung im Magensafte zusammenhängen.

Ich habe deshalb bei mehreren Fällen von Ulcus ventriculi, die intravenös mit Vaccineurin behandelt wurden, wodurch nach *Hollers*[3]) Mitteilung in der Reaktionszeit ein beträchtlicher Anstieg der Pepsinwerte erzielt wurde, vor der Injektion, 4 Stunden nach der Injektion (Reaktionszeit) und 24 Stunden nach der Injektion gleichzeitig die Antipepsinwerte im Serum und die Pepsinmengen im Magensafte geprüft und folgende Resultate erhalten:

Name	Abbauende Serummenge nach 4 Std. im Brutschrank	Pepsinwerte	Diagnose
	I. Vor der Injektion.		
Sp.	0,1	1,41	Ulcus duodeni
B.	0,1	0,14	Ulcus ventriculi
H.	0,1	0,85	Ulcus ad pylorum
Hl.	0,1	0,88	Ulcus duodeni
	II. 4 Stunden nach der Injektion.		
Sp.	0,1	2,35	Ulcus duodeni
B.	0,3	1,88	Ulcus ventriculi
H.	0,1	0,79	Ulcus ad pylorum
Hl.	0,5	0,50	Ulcus duodeni
	III. 24 Stunden nach der Injektion.		
Sp.	0,1	1,01	Ulcus duodeni
B.	0,1	1,21	Ulcus ventriculi
H.	0,1	0,97	Ulcus ad pylorum
Hl.	0,1	1,53	Ulcus duodeni

[1]) Mitteilungen aus dem Grenzgebiete 25, 1913.
[2]) l. c.
[3]) Arch. f. Verdauungskr. 29, H. 3 und 4.

Wir sehen also in der Hälfte der Fälle ein Sinken, in den anderen Fällen ein Gleichbleiben der Antipepsinwerte in der Reaktionszeit der intravenösen Vaccineurininjektionen, während die Pepsinwerte in dieser Zeit größtenteils gestiegen sind. Das Verhalten der Antipepsinwerte war also vollkommen unabhängig vom Steigen der Pepsinwerte in der Reaktionszeit. Um aber sicher zu sein, daß der Antipepsingehalt des Serums mit der Pepsinausscheidung im Magensafte in keinem ursächlichen Zusammenhange stehe, habe ich als Kontrollversuch die Methode *Oguros* derart modifiziert, daß ich an Stelle einer 1 prom. Pepsinlösung das Serum des Patienten mit dem von ihm gleichzeitig entnommenen Magensafte in Verbindung brachte. Denn ich müßte, wenn die oben erwähnte Ansicht *Liebleins* zu Recht besteht, bei Verwendung des eigenen Magensaftes immer bei gleicher Serummenge eine Hemmung des Pepsinabbaues feststellen können. Ich sah aber in zahlreichen derartigen Versuchen, daß die zur Abbauhemmung notwendige Serummenge in den einzelnen Fällen sehr verschieden groß war, ja selbst manchmal über 1 bzw. unter 0,1 ccm hinausging. Damit ist aber auch bewiesen, daß das Antipepsin kein wirkliches Antiferment im Sinne der *P. Ehrlich*schen Immunitätslehre sein kann, da zur Antifermentwirkung außer einer Hemmung der Fermentwirkung auch der Nachweis des ursächlich genetischen Zusammenhanges mit dem Ferment notwendig ist. Es hätte demnach bei Steigerung der Pepsinproduktion im Magen und somit der Pepsinresorption im Blute auch eine Steigerung der Antipepsinproduktion im Blute auftreten müssen. Da wir also das Antipepsin als Antiferment ablehnen, müssen wir dasselbe als „Paralysator" ansehen, d. h. als eine chemische Substanz, welche die Fermentwirkung des Pepsins dadurch aufhebt, daß sie mit ihm eine chemische Verbindung eingeht [*G. Bredig*[1])]. In der Literatur sind ja auch zahlreiche Paralysatoren des Pepsins beschrieben. Ich erwähne hier nur alle Metallsalze, Chloroform, Formaldehyd bzw. Phenol [*Zopolsky*[2])], ferner in geringem Maße alle Alkaloide [*Chittenden* und *Allan*[3])], endlich Chloride, Jodide, Nitrate, Sulfate, Acetate und Rhodanide [*J. Schütz*[4])].

Wie können wir uns also das Sinken der Antipepsinwerte in der Hälfte der Fälle während der Reaktionszeit einer intravenösen Vaccineurininjektion erklären? Wir wissen nach den Arbeiten *Kollert-Starlingers*[5]), daß in der Mehrzahl der Fälle die Albuminmenge des Serums

[1]) Asher-Spiros Ergebn. d. Phys. 1, 134, 1903.
[2]) *Hoppe-Seiler*, Med. chem. Untersuch. 4.
[3]) Malys Jahrb. 15, 277; 20, 248.
[4]) Über die Hemmung der Pepsinwirkung durch Salze. Hoffmeisters Beitr. 5, 406, 1904.
[5]) Zeitschr. f. d. ges. exper. Med. 30, H. 1/6, S. 311.

in der Reaktionszeit der Vaccineurininjektion abnimmt. Da aber nach *Oppenheimer*[1]) eine Adsorption der Fermente durch andere Kolloide stattfinden kann, wäre es denkbar, daß beim Antipepsinnachweis nach der Methode *Oguros* das Pepsin im Reagenzglase zuerst das Albumin des zu untersuchenden Serums verdaut, selbst aber dabei vom Albumin des Serums adsorbiert und seiner eiweißverdauenden Wirkung benommen wird, infolgedessen das mit Carmin gefärbte Fibrin bzw. die Ricinlösung nicht angreift, wodurch eine positive Antipepsinwirkung vorgetäuscht wird.

Scheinbar im Widerspruch mit dieser Behauptung stehen die Versuche von *H. Sachs*[2]), der bei einer Gans nach 2½ Monate langer täglicher intraabdomineller Injektion steigender Mengen einer 1 proz. Pepsinlösung eine Vermehrung des Antipepsins im Serum auftreten sah. Da aber die von diesem Autor vorgenommenen Kontrollversuche an Hunden und Ziegen kein positives Resultat ergaben, andererseits aber auch bei Gänsen nach 1½monatiger Injektion mit der 1 proz. Pepsinlösung keine Vermehrung des Antipepsins aufgetreten ist, sondern erst bei starker, noch einen Monat lang fortgesetzter Steigerung der Pepsindosis die Antipepsinwerte sich erhöhten, einer weiteren Steigerung aber nicht mehr fähig waren, glaube ich, daß auch dieser Versuch, der als einziger Beweis der Antifermentbildung in der Literatur angeführt ist, nicht einwandfrei in diesem Sinne verwertet werden kann. Insbesondere haben uns die Versuche *Hedins*[3]) gezeigt, daß das Serumalbumin allein auch imstande ist, Trypsin zu adsorbieren und so eine Antitrypsinwirkung als spezifische Antifermentwirkung uns vorzutäuschen. Es könnte also auch möglich sein, daß durch die Pepsininjektionen bei der Gans eine Änderung des Bluteiweißbildes hervorgerufen worden ist und die Zunahme des Albumins im Serum analog den *Hedin*schen Versuchen eine vermeintliche Zunahme des Antipepsins zur Folge gehabt hätte. Es müßte also, wenn obige Annahme zu Recht bestehen soll, eine Globulinlösung allein nicht imstande sein, eine Hemmung der Eiweißverdauung herbeiführen zu können, andererseits aber eine durch Fällung mit Ammonsulfat und Dialyse gewonnene Serumalbuminlösung, ebenso wie das Serum eine Hemmung des Pepsinabbaues bewirken. Um diese Frage aufzuklären, modifizierte ich die Methode *Oguros* derart, daß ich in der ersten Reihe beim Antipepsinnachweis eine 10proz. Serumlösung, in der zweiten Reihe eine 10proz. Globulinlösung und in der dritten Reihe eine 10proz. Serumalbuminlösung in von 0,1 bis 1 ccm steigenden Mengen verwendete. Im übrigen hielt ich mich genau nach den Vorschriften *Oguros*. Nach vierstündigem

[1]) Biochemie. Leipzig, Thieme, 1920.
[2]) Fortschr. d. Med. 1, 425, 1902.
[3]) Zeitschr. f. d. phys. Chem. 52, 412; 50, 497.

Verweilen im Brutschrank konnte ich tatsächlich eine Hemmung des Fibrinabbaues mit 0,3 ccm der 10proz. Serumlösung und auch dieser 10proz. Albuminlösung bei Verwendung von Ricin und Carminfibrin als Indikator erzielen, während die 10proz. Globulinlösung keine Abbauhemmung zeigte. Wir sehen also, daß die Antipepsinwirkung einzig und allein nur vom Albumingehalt des Serums abhängig ist. Erklärlich wird es jetzt auch, was ich vorhin erwähnt habe, daß *Lieblein* und *Oguro* bei chronischer Nephoritis eine Verringerung der Antipepsinwerte im Blutserum finden konnten. Denn nach den Befunden *Kollert-Starlingers* zeigten diese Erkrankungen ein Sinken der Albuminmenge und infolge der Hydrämie auch ein Sinken des Gesamteiweißes des Serums. Aus diesem Grunde wird bei dieser Erkrankung das Pepsin im Reagenzglase nicht vollkommen vom Albumin des Serums adsorbiert und kann daher auch das Carminfibrin bzw. die Ricinlösung verdauen.

Zusammenfassend möchte ich also sagen, daß der Begriff des Antipepsins als spezifisches Antiferment abgelehnt werden muß und nur die Höhe des Albumingehaltes im Serum maßgebend für die Stärke der Hemmung des Pepsinabbaues durch das Serum ist. Daraus ergibt sich auch, daß der Mangel an Antipepsinferment in der Magenschleimhaut oder im Blutserum nicht als die Ursache einer Ulcusentstehung im Magen bzw. Duodenum angesehen werden kann.

Das Verhalten des Harnstoffes und der Nichtharnstoff-fraktion des Reststickstoffes bei Herz- und Nierenkranken.

Von

Hugo Pribram und **Otto Klein.**

(Aus der medizinischen Klinik der Deutschen Universität in Prag.)

(Eingegangen am 27. Juli 1923.)

Seit mehr als 20 Jahren betrachtet man auf Grund der Arbeiten von *Jaksch, Senator, Strauss, Hohlweg* und verschiedenen anderen die Höhe des Reststickstoffs (R-N) als Maß der Niereninsuffizienz.

Diese Tatsache hat vom klinischen Gesichtspunkte aus für Diagnose und Prognose damit die größte Bedeutung gewonnen, daß der Nachweis extrem hoher R-N-Werte (*Jaksch*) auf das Bestehen einer irreparabeln schwersten Niereninsuffizienz (azotämische, Retentions- oder echte Urämie nach *Volhard-Strauss*) schließen läßt. Wenn auch bei derartigen Zuständen die Retention eine große, oft auch die wichtigste Rolle spielt, so haben doch neuere Untersuchungen gezeigt, daß die Retention nur *eine* der Komponenten darstellt, von welchen die Höhe des R-N abhängt, und daß auch andere pathologische Faktoren bei verschiedenen Krankheitszuständen den R-N-Spiegel beeinflussen können. Dies gilt sowohl für die Fälle extremster Azotämie als auch für mäßiggradige Schwankungen des R-N.

Eine Erhöhung des R-N kann folgende Ursachen haben:

1. Die Retention, die bekanntlich bei den verschiedensten Nierenaffektionen, aber auch bei Herzkrankheiten mit Hydrops und Stauungsniere von Bedeutung ist.

2. Die Mehrproduktion durch Eiweißzerfall. Solche findet sich bei Fieber (*F. Wagner*), Carcinom, parenteraler Eiweißzufuhr usw., aber auch bei der echten Urämie.

3. Die Wirkung extrarenaler Einflüsse, z. B. plötzliches Einströmen von Ödemtranssudat aus den Geweben in die Blutbahn und Mitreißen von stickstoffhaltigen Substanzen aus der Ödemflüssigkeit und den Geweben bei Nieren- und Herzkranken (*Monakow, O. Klein*).

4. Die Kombination mehrerer der genannten Faktoren. Dies ist bei Nierenkranken öfters der Fall, so im Stadium der Ödemresorption, insbesondere aber bei der echten Urämie [*H. Pribram* und *O. Klein*[1])].

Es sei hinzugefügt, daß der unter Punkt 3 erwähnte extrarenale Faktor in negativem Sinne wirken kann, indem bei bestehender Reten-

---

[1]) *H. Pribram* und *O. Klein,* Med. Klinik 1923, Nr. 23.

tion diese bei gleichzeitiger rapider Ödembildung und dadurch bedingtem schnellen Austritt der retinierten stickstoffhaltigen Substanzen aus der Blutbahn in die Gewebe mit dem Ödemtranssudat verdeckt werden kann. Dies kann sowohl bei Nieren- als auch insbesondere bei Herzkranken der Fall sein (latente Retention, *O. Klein*).

Es ist im gegebenen Falle nicht immer leicht, den Komplex der Einflüsse zu analysieren. Mehrjährige Beobachtungen haben uns gezeigt, daß eine solche Analyse oft ermöglicht ist durch Berücksichtigung des quantitativen Verhaltens der einzelnen Bestandteile des R-N und ihres Verhältnisses zum Gesamt-R-N. Wir sind in der Weise vorgegangen, daß wir 1. den Gesamt-R-N, 2. den Harnstoff bestimmten, 3. den Nichtharnstoffanteil des R-N berechneten, 4. den sogenannten Doppelstickstoff (D-N) (*Hahn*) ermittelten, welcher die Differenz der N-Werte der Filtrate nach Trichloressigsäure- und Phosphorwolframsäurefällung (Methodik s. weiter unten) darstellt[1]).

Dieser D-N stellt somit eine Fraktion, d. h. ein Gemenge verschiedener stickstoffhaltiger Substanzen dar, unter welchen die höhermolekularen Eiweißabbauprodukte, auf deren Bedeutung für die Entstehung der Urämie *H. Pribram* wiederholt hingewiesen hat, eine wichtige Rolle spielen dürften.

Wir konnten bestimmte Gesichtspunkte dadurch gewinnen, daß wir das klinische Verhalten der Fälle eingehendst berücksichtigt haben (Verhalten der Herzkraft, Blutdruck, Bildung bzw. Resorption von Ödemen, Wasserausscheidung, Nierenfunktion), daß wir ferner bei einer Reihe von Fällen mit Änderung des Krankheitsbildes wiederholte Untersuchungen angestellt haben, und daß wir neben der Bestimmung des R-N und seiner Fraktionen das Serum noch anderweitig untersucht haben (Refraktion, Cholesteringehalt usw.), Werte, die wir in den Tabellen nicht angeführt haben.

In der tabellarischen Zusammenstellung der Fälle haben wir der Übersicht halber vier Gruppen unterschieden:

1. Die Nieren- und Herzgesunden, 2. die Fälle von unkompliziertem Herzfehler im Stadium der Dekompensation, 3. Nierenkranke mit und ohne Herzinsuffizienz, mit und ohne Ödeme, mit geringer oder ohne Niereninsuffizienz, 4. Nierenkranke mit hochgradiger, absoluter Niereninsuffizienz (azotämische Urämie).

Bei den Nieren- und Herzgesunden und bei einem großen Teile der Nierenkranken, welche weder höhergradige Niereninsuffizienz, noch Ödeme zeigten, war bei normalem R-N-Gehalt des Blutes der prozentuelle Anteil desselben an Harnstoff und D-N in größerem Ausmaße schwankend.

[1]) Da die Phosphorwolframsäure neben dem Eiweiß noch eine Reihe anderer Stoffe fällt, so erhält man durch die Differenz der Stickstoffwerte beider Filtrate den Stickstoffgehalt einer Fraktion, die nur durch Phosphorwolframsäure, aber nicht durch Trichloressigsäure gefällt wird.

Die Gründe dieser Schwankungen sind zum Teil bekannt; insbesondere spielt der Eiweißabbau bei einer großen Zahl von Fällen eine wichtige Rolle. Wie *Hahn* nachgewiesen hat und wir bereits in einer früheren Arbeit[1]) bestätigen konnten, findet der erhöhte Eiweißabbau seinen Ausdruck in der Erhöhung jener Fraktion, die als D-N bezeichnet und bestimmt wurde. In unserer früheren Mitteilung ist eine große Anzahl von Fällen mit erhöhtem D-N angeführt, bei denen das Bestehen von Eiweißzerfall sichergestellt werden konnte (Gangrän, Carcinom, Fieber usw.). Wir verweisen diesbezüglich auf unsere frühere Arbeit. Bei all diesen Fällen findet sich naturgemäß bei hohem prozentualen Anteil des D-N am R-N eine prozentuale Zurückdrängung des Harnstoffanteils am gesamten R-N. Als Beispiel diene hier Bestimmung Nr. 6 (exulceriertes Uteruscarcinom), wo der Harnstoffstickstoff (U+-N) nur 47 Proz. des R-N ausmacht.

Andererseits sind bei Nierengesunden und Nierenkranken ohne Niereninsuffizienz nicht alle Gründe für die Schwankungen des relativen Anteils der einzelnen Komponenten am gesamten R-N bekannt; welcher Art sie sind, darüber lassen sich nur Vermutungen anstellen, auf die hier nicht weiter eingegangen werden soll. Eine Gesetzmäßigkeit läßt sich vorläufig nicht finden.

Bei den hydropischen Herz- und Nierenkranken (zweite und dritte Gruppe der Tabelle) ließen sich folgende Gesetzmäßigkeiten feststellen. Im Stadium der Oligurie und Ödembildung kann bei Nieren- und Herzkranken die fast stets vorhandene Retention mit oder ohne R-N-Erhöhung im Serum einhergehen (manifeste und latente Retention). In jedem Falle aber konnten wir eine Erhöhung des relativen Anteils des U+-N am gesamten R-N finden. Dies findet seine Erklärung darin, daß der Nichtharnstoff-N in höherem Maße in den Geweben festgehalten wird als der U+-N. Beispiele hierfür sind unter den Nierenkranken: Bestimmungen Nr. 29, 48, 60, 75, 86, 91, 99, 101, 109; unter den Herzkranken: Bestimmungen Nr. 14, 21, 27.

Bei Ödemresorption sowohl bei Herz- als auch bei Nierenkranken konnten wir oft gleichzeitig mit der Abnahme der Serumrefraktion ein Sinken des relativen Harnstoffanteils des R-N finden und damit naturgemäß ein Ansteigen des relativen Anteils des Nichtharnstoff-N am R-N. Offenbar werden in solchen Fällen die im Stadium der Ödembildung in den Geweben festgehaltenen Substanzen des R-N in das Serum eingeschwemmt. Da, wie bereits erwähnt, im Stadium der Ödembildung die Nichtharnstofffraktion des R-N in höherem Maße als der Harnstoff in den Geweben festgehalten wird, ist es begreiflich.

[1]) *H. Pribram* und *O. Klein*, Acta medica scandinavica 58, Fasc. II bis III, S. 123, 1923.

daß dieselben Substanzen bei der Ödemresorption in das Blut eingeschwemmt, zu einer Erhöhung des Nichtharnstoffanteils des R-N führen. Dazu kommt noch, daß der Harnstoff zu den leicht diffusibeln harnfähigen Substanzen gehört, dessen Ausscheidung relativ leicht erfolgt[1]).

Beispiele hierfür sind folgende Fälle im Stadium der Ödementwässerung: Bestimmungen Nr. 11, 16, 26, 34, 46, 47, 55, 56, 62, 77, 84, 92.

Bei der Niereninsuffizienz haben wir in unserer früheren Arbeit zwei Stadien unterschieden: a) Das Stadium der reinen Retention mit Anstieg des R-N und U^{+}-N, bei hohem relativen Anteil des letzteren am ersteren. Der D-N wurde fast stets niedrig gefunden.

Klinisch fehlen in diesem Stadium jedwede Symptome einer manifesten Urämie, und es sind nur präurämische Symptome, wie Mattigkeit, dyspeptische Beschwerden und dergleichen vorhanden.

b) Das zweite Stadium, wo zur Retention noch der Eiweißzerfall hinzutritt, ja sogar in den Vordergrund treten kann. Hier finden wir das ausgeprägte Symptomenbild der echten Urämie, die wohl mit Berechtigung als Eiweißzerfallstoxikose aufzufassen ist (große Atmung, subnormale Temperatur, Muskelzucken, Diarrhöen, Erbrechen, Somnolenz, schließlich Coma). Der R-N zeigt hier die extremsten Werte, der Harnstoffanteil desselben tritt auch bei absolut hohem Werte prozentuell gegenüber dem Nichtharnstoff-N in den Hintergrund. Dagegen ist der D-N meist absolut und prozentual sehr erhöht.

Offenbar dürfte es sich hier um die Vermehrung hochmolekularer toxischer Eiweißabbauprodukte handeln, auf deren Bedeutung für die Genese der Urämie, wie schon erwähnt, der eine von uns (*H. Pribram*) auf Grund chemischer und tierexperimenteller Untersuchungen hingewiesen hat. Bei den hier angeführten Fällen von echter Urämie finden sich solche, bei denen die genannten beiden Stadien in ihrer zeitlichen Aufeinanderfolge deutlich ersichtlich sind, während bei anderen nur das eine oder das andere Stadium im Zeitpunkte der Untersuchung getroffen werden konnte.

Beispiele für reine Retention: Bestimmungen Nr. 129, 132, 136, 140; für Retention und Eiweißzerfall: Bestimmungen Nr. 133, 134, 135, 137, 142, 144; 145; dabei konnten bei drei Fällen die Bestimmungen sowohl im ersten als auch im zweiten Stadium vorgenommen werden (Nr. 132 und 133, 136 und 137, 140 und 142).

Zur Methodik sei kurz folgendes bemerkt. Die Untersuchungen wurden an Patienten vorgenommen, welche andauernd unter eiweißarmer Nahrung standen. Das Blut wurde durch Venäpunktion in den

[1]) Im Einklang damit steht unser seinerzeitiger Befund einer Erhöhung des D-N im Stadium der Ödemresorption. Damit könnten die bisweilen klinisch in Erscheinung tretenden toxischen Erscheinungen bei schneller Ödemresorption in Zusammenhang stehen.

Morgenstunden, ohne daß eine Eiweißzufuhr vorangegangen war, entnommen. Die N-Bestimmungen wurden stets mit mindestens einer Kontrolle vorgenommen und bei nicht ganz gut übereinstimmenden Werten öfters wiederholt. Der R-N wurde nach Trichloressigsäurefällung des Serums mit der Halbmikromethode, welche auch *Hahn* verwendet hat, bestimmt. Das Filtrat wurde stets vor der weiteren Verarbeitung mit Sulfosalicylsäure auf seine Eiweißfreiheit geprüft. Letzteres ist unbedingt notwendig, da es sich herausgestellt hat, daß bei Verwendung einer stets gleich großen Menge von Trichloressigsäure bei verschieden eiweißreichen Seren die Enteiweißung nicht immer vollständig gelingt. Wir haben deshalb die sonst allgemein übliche Methode der Eiweißfällung folgendermaßen modifiziert. Zuerst wurde durch Refraktometrie der annähernde Eiweißgehalt des Serums ermittelt und danach die zur Enteiweißung notwendige Menge von Trichloressigsäure als Fällungsmittel hinzugefügt. Wir haben zu diesem Behufe vorher eine Serie von Enteiweißungsversuchen gemacht und auf diese Weise empirisch die bei einem bestimmten Eiweißgehalt des Serums zur vollständigen Enteiweißung jeweils notwendige Menge des Fällungsmittels eruiert. Es ergab sich, daß sowohl bei Verwendung von zu wenig als auch von zu viel Trichloressigsäure die Enteiweißung nicht vollständig gelingt. Dies machte sich besonders bei Seren mit geringem Eiweißgehalt (Hydrämie) geltend, bei denen die Enteiweißung nur bei einer ganz bestimmten Menge des Fällungsmittels komplett war, während bei höherem Eiweißgehalt die Dosierungsbreite des Fällungsmittels zur Erreichung vollständiger Enteiweißung viel größer war. Diese Tatsache erscheint uns nicht unwichtig und sollte stets überall dort, wo es, wie bei R-N-Bestimmungen, auf vollständige Enteiweißung ankommt, berücksichtigt werden. Die empirisch gefundene Enteiweißungsskala soll gelegentlich an anderer Stelle mitgeteilt werden.

Zur Ermittlung des Doppelstickstoffs wurde außer der Bestimmung des Stickstoffs im Filtrate nach Trichloressigsäurefällung noch der Stickstoff des Filtrats nach Phosphorwolframsäurefällung ermittelt und die Differenz beider als Doppelstickstoff nach *Hahn* bezeichnet. Auch bei der Phosphorwolframsäurefällung ergab es sich als notwendig, die Menge des Fällungsmittels nach dem vorher ermittelten Eiweißgehalte des Serums zu modifizieren. Das Phosphorwolframsäurereagens war nach den Angaben von *Hahn* dargestellt. Leider konnten wir nur bei einer beschränkten Zahl von Fällen den Doppelstickstoff bestimmen, da uns nur eine Zeitlang ein geeignetes Phosphorwolframsäurereagens zur Verfügung stand. Der Harnstoff wurde mit der Sojabohnen-(Urease-)methode bestimmt (*Marshall-Slyke-Eigenberger*). Das Ferment wurde auf seine Leistungsfähigkeit wiederholt geprüft. Harnstofflösungen von bestimmter Konzentration ergaben eine Ausbeute von 95 Proz. Bei allen vorgenommenen Bestimmungen (R-N, U+-N, D-N) wurde der durch Leerbestimmung ermittelte Gehalt der Reagenzien an N bzw. NH_3 berücksichtigt.

Zusammenfassung.

1. Die Höhe des R-N-Spiegels des Blutes ist abhängig von einer Reihe verschiedener Einflüsse, die zum Teil ermittelt werden können, wenn man den prozentualen Anteil des Harnstoffs bzw. des Nichtharnstoffs am gesamten R-N berücksichtigt.

2. In der Nichtharnstofffraktion des R-N ist die nach *Hahn* als D-N bezeichnete Fraktion (Differenz der N-Gehalte der Filtrate nach Trichloressigsäure- und Phosphorwolframsäurefällung) enthalten, der anscheinend eine für die Pathologie wesentliche Bedeutung zukommt. Diese Fraktion enthält wahrscheinlich unter anderem den Stickstoff hochmolekularer Eiweißabbauprodukte und kann daher als Maß des Eiweißzerfalles gelten.

3. Beim Normalen, beim Herz- und Nierengesunden ist der relative Anteil der erwähnten Fraktion am gesamten R-N in großer Breite schwankend. Bei erhöhtem Eiweißzerfall (Fieber, Carcinom, Gewebseinschmelzung, Gangrän usw.) pflegt in der Regel der prozentuale Anteil des U^{+}-N am R-N in den Hintergrund gedrängt zu werden, während die Werte für den D-N relativ hoch sind.

4. Sowohl bei Nieren- als auch bei hydropischen Herzkranken findet sich im Stadium der Oligurie und Ödembildung ein relativer Anstieg des Harnstoffanteils des R-N. Letzteres kann als Indikator für bestehende Retention gelten.

5. Im Stadium der Ödementwässerung und Polyurie sinkt der relative Harnstoffanteil des R-N unter relativem Anstieg der Nichtharnstofffraktion und des D-N ab.

6. Bei der Niereninsuffizienz steigt mit fortschreitender Retention der relative Anteil des Harnstoffs am R-N wesentlich an. Im Terminalstadium bei extremster Niereninsuffizienz (azotämische Urämie) wird der Harnstoffanteil des R-N durch den Nichtharnstoffanteil zurückgedrängt; in diesem Stadium ist auch der D-N sehr hoch. Der Gesamt-R-N kann schon im ersten Stadium extrem hohe Werte zeigen, im zweiten Stadium pflegt er allerdings in der Regel noch etwas anzusteigen. Klinisch finden sich im ersten Stadium (Stadium der reinen Retention) meist nur präurämische Symptome, während im zweiten Stadium (Retention und Eiweißzerfall) die manifesten Symptome der azotämischen Urämie (Coma und dergleichen) vorliegen.

7. Methodisch von Wichtigkeit ist es, bei Bestimmungen des R-N und seiner Fraktionen zuvörderst den Eiweißgehalt des Serums zu ermitteln, je nach der Höhe desselben die Menge des Fällungsmittels entsprechend zu modifizieren und sich jedesmal von der vollständigen Eiweißfreiheit des Filtrats zu überzeugen.

Übersicht über die untersuchten Fälle.

Nr.	Fall	Diagnose	Datum	R-N	U+-N	D-N	Proz. d. R-N		Bemerkungen
							U+-N Proz.	D-N Proz.	
				I. Herz- und Nierengesunde.					
1	P.	—	—	18	—	3	—	16,6	
2	I.	Polycythämie	1. V.	30,6	22,4	—	73	—	
3	S. ♀	Iridocyclitis	4. V.	22,4	18,2	—	81	—	Normalfall
4	B. ♀	Typhus abdom. Ikterus, Gravid.	—	38,8	6,47	—	16,6	—	Fieber, Oligurie, keine Ödeme
5	O. ♀	Ikterus, Carcin. hepatis	13. VI.	28,29	14,7	—	51,9	—	Oligurie, geringe Ödeme
6	M.	Anämie, Ca ut. Infiltr. d. Ureter	12. VI.	69,3	37,68	—	54,2	—	Ödeme stark
7	J. ♀	Diabetes insip. Lues	8. VI.	31,33	24,2	—	76,9	—	Polyurie, keine Ödeme
8	K.	Hemiplegie Diabetes mell.	7. VII.	37,24	32,738	—	87,9	—	Harnmenge normal
9	K. ♂	Acromegalie	7. X.	41	—	8	—	20	Oligurie. Ödeme
10	K. ♂	Diabetes mell.	9. VII.	20,9	20,8	—	100	—	Keine Acidose, keine Ödeme
				II. Reine Herzkranke.					
11	M. ♀	Insuffizienz et sten. valv. mitralis	18. IV.	23	12,88	—	56	—	Polyurie, Ödeme im Abnehmen
12	M. ♀	Insuff. et sten. valv. mitr., Dekompens	23. IV.	26	15,96	—	61	—	Polyurie, Ödeme im Abnehmen
13	M. ♀	Myodeg. cord., Emphysem	5. V.	35	21,0	—	60	—	Starke zunehmende Oligurie u. Ödeme, Sekt.-Bef.: 17. V.
14	M. ♀	Myodeg. cord., Emphysem	9. V.	44,8	40,6	—	90,6	—	Emphysem, Myodeg. cord., Stauungsniere
15	B. ♀	Vitium cord. (Insuffizienz et sten. mitralis)	18. V.	44,8	22,4	—	50	—	Oligurie, Ödeme, Sekt.-Bef.: 26. V. Insuff. et sten. valv. mitralis, Embolie cereb. Hemiplegie. Stauungsniere
16	V. ♀	Kyphoskoliose Insuffizienz cord.	18. V.	39,2	16,8	—	43	—	Ödeme, Harnmenge normal, Ödementleerung
17	V. ♀	Kyphoskoliose Insuffizienz cord.	12. VI.	33,9	20,6	—	60,7	—	Ödeme, Oligurie
18	V. ♀	Kyphoskoliose Insuffizienz cord.	3. VII.	48,81	28,028	7,71	57,4	15,8	Ödeme, Oligurie stärker, Sekt.-Bef.: 4. VII. Kyphoskoliose, Herzinsuff.
19	Z.	Vitium cord. aort. et mitralis, Lues	15. VI.	59,53	27,11	—	45,5	—	Hochgradige Oligurie Sekt.-Bef.: 15. VI. Mesaort. luica, Stauungsniere
20	Z.	Vitium cord. aort. et mitralis, Lues	—	39,98	31,16	—	77,9	—	Hochgradige Oligurie Sekt.-Bef.: 15. VI. Mesaort. luica, Stauungsniere
21	Sch. ♂	Vitium cord. Cirrh. hepatis	2. VI.	33	—	—	100	—	Oligurie, Ödeme, Ascites
22	U. ♀	Insuffizienz valv. mitralis et aort. et Endocarditis lenta	15. VI.	33,6	26,46	—	78,7	—	Einsetzende Diurese, Ödeme
23	V. ♀	Endocarditis Tbc. mil. acuta, Stauungsniere	12. V.	29,4	16,8	—	57,1	—	Ödeme, mäß. Oligurie, Herzschwäche, Sekt.-Bef.: Endocarditis, miliare Tuberkulose
24	K. ♂	Myodegen. cord.	18. IV.	32,2	20,5	3,08	63,6	9,5	Oligurie, mächtiger Hydrops univ.
25	K. ♂	Myodegen. cord.	8. V.	42	32,2	—	76,7	—	Oligurie

II. Reine Herzkranke. (Fortsetzung.)

Nr.	Fall	Diagnose	Datum	R-N	U+-N	D-N	Proz. d. R-N		Bemerkungen
							U+-N Proz.	D-N Proz.	
26	*K.* ♂	Myodegen. cord.	17. V.	54,6	28	—	51	—	Harnflut (>1 l), starke Körpergewichtsabnahme
27	*K.* ♂	Myodegen. cord.	29. V.	61,6	53	—	86	—	Starke Oligurie, Gewichtszunahme, Sekt.-Bef.: 30. V. Myomalacia cordis, Stauungsniere, Coronarsklerose

III. Nierenkranke mit oder ohne Herzinsuffizienz.

28	*C. B.* ♀	Maligne Nephrosklerose, Ca. ventr. Enzephalomal., Niereninsuffizienz, Hyposthenurie	12. X.	61	—	19	—	31	Harnmenge normal, keine Ödeme
29	*C. B.* ♀	Maligne Nephrosklerose, Ca. ventr. Enzephalomal., Niereninsuffizienz, Hyposthenurie	21. III.	71,4	65,8	—	92	—	Harnmenge gering, keine Ödeme
30	*C. B.* ♀	Maligne Nephrosklerose, Ca. ventr. Enzephalomal., Niereninsuffizienz, Hyposthenurie	16. IV.	59	40,6	11,4	68,8	19,3	Harnmenge normal, keine Ödeme
31	*C. B.* ♀	Maligne Nephrosklerose, Ca. ventr. Enzephalomal., Niereninsuffizienz, Hyposthenurie	5. V.	72,8	51,8	—	71,1	—	Harnmenge erhöht, keine Ödeme
32	*C. B.* ♀	Maligne Nephrosklerose, Ca. ventr. Enzephalomal., Niereninsuffizienz, Hyposthenurie	26. V.	54,6	51,8	—	94	—	Harnmenge reichlich, keine Ödeme, lange andauernde Entwässerung
33		Nephrosklerose, Insuff. aortae, Lues	16. X.	63,9	—	18,2	—	28,5	Oligurie, starke Ödeme
34	*H.* ♂	Nephrosklerose, Insuff. aortae, Lues	12. IX.	66,5	—	38,6	—	58	Harnmenge normal, stark. Ödeme, Sekt.-Bef.: 4. XII. Nephrosklerose, Endocarditis, Insuffizienz aortae
35	*T.* ♂	Nephrose, Lues	—	48	—	10	—	21	Keine Ödeme, Diurese normal
36	*T.* ♂	Nephrose, Lues	23. V.	—	41,3	—	77	—	
37	*M.* ♀	Nephrosklerose	—	39	—	2,2	—	5,6	Keine Ödeme
38	*M.* ♀	Nephrosklerose	23. VI.	39,28	33,5	—	85,3	—	
39	*M.* ♀	Nephrosklerose	—	39	—	2	—	5	
40	*Sch.* ♀	Nephrose	—	30	—	6	—	20	Oligurie, mächtige Ödeme
41	*Sch.* ♀	Nephrose	—	29	—	6	—	20,7	Oligurie, mächtige Ödeme
42	*Z.* ♀	Nephritis chron., Gravid.	—	34	—	5,1	—	15	Keine Ödeme, normale Harnmenge
43	*S.* ♀	Nephrosklerose	—	44,5	—	18	—	40	Ödeme
44	*S.* ♀	Nephrosklerose	—	48,3	—	4	—	8,2	Ödeme
45	*O.* ♀	Nephritis chron.	3. V.	30	—	1,2	—	4	Hochgradige Oligurie, Ödeme
46	*P.* ♀	Nephrosklerose	14. V. 1922	62,8	29,4	26	46,8	41,4	Polyurie, Ödemresorption
47	*P.* ♀	Nephrosklerose	19. III. 1923	55	23,8	—	43	—	Polyurie, Ödemresorption, starke Gewichtsabnahme
48	*P.* ♀	Nephrosklerose	22. V.	47,4	43,4	—	91	—	Hochgradige Oligurie, hochgrad. Ödeme, Gewichtszunahme

III. Nierenkranke mit oder ohne Herzinsuffizienz. (Fortsetzung.)

Nr.	Fall	Diagnose	Datum	R-N	U+-N	D-N	Proz. d. R-N U+-N Proz.	Proz. d. R-N D-N Proz.	Bemerkungen
49	*P.* ♀	Nephrosklerose	26. V.	36,4	33,6	—	92	—	Leichter Diureseanstieg, Ödeme, geringe Gewichtsabnahme
50	*K.* ♀	Nephritis subac.	1. VI	41	—	11	—	27	Harnmenge normal, geringe Ödeme
51	*K.* ♂	Nephritis chron.	2. IX.	42	—	11	—	26	Leichte Ödeme, Polyurie
52	*K.* ♂	Nephritis chron.	21. III.	66,3	41,8	—	63	—	Leichte Ödeme, Polyurie
53	*K.* ♂	Nephritis chron.	8. V.	58,8	36,4	—	62	—	Polyurie, kein. Ödeme
54	*C.* ♀	Nephritis chron.	13. IX.	66,9	—	22	—	34	
55	*C.* ♀	Nephritis chron.	15. III.	32,5	25,2	—	77,5	—	Refraktion 52, beginnende Ödemresorption, Harnmenge reichlich, Ödeme, Körpergewicht: 91,3 kg
56	*C.* ♀	Nephritis chron.	18. IV.	30,6	11,34	14,66	37	47,8	Harnmenge reichlich, Ödeme fast geschwunden, Körpergew.: 75,700 kg
57	*L.* ♀	Nephritis acut.	16. III.	50,4	28	—	55	—	Polyurie, Ödemresorption
58	*L.* ♀	Nephritis acut.	19. IV.	30,6	11,34	13,8	37	45,1	Harnmenge normal, keine Ödeme
59	*L.* ♀	Nephritis acut.	8. VI.	34,8	25,2	—	72,4	—	Harnmenge normal, keine Ödeme
60	*M.* ♀	Nephritis acut.	14. II.	70	70	—	100	—	Anurie, keine Urämie, leichte Ödeme
61	*M.* ♀	Nephritis acut.	24. II.	—	26,6	—	—	—	Polyurie, Ödeme im Schwinden, Gewichtsabnahm. 7 kg
62	*M.* ♀	Nephritis acut.	17. IV.	19,8	12,88	4,62	64,82	23,2	Harnmenge normal, keine Ödeme
63	*M.* ♀	Nephritis acut.	4. V.	56	39,2	—	69	—	Harnmenge leicht erhöht
64	*R.* ♂	Maligne Nephrosklerose	—	38,3	31,5	—	82,2	—	Harnmenge normal, keine Ödeme — Retinitis albuminurica
65	*D.* ♀	Maligne Nephrosklerose, Aneur. aortae, Lues	—	64	—	15	—	23	Oligurie, Ödeme
66	*G.* ♀	Nephritis, Insuff. valv. mitralis	29. VIII.	33	—	4	—	12	Harnmenge normal, keine Ödeme
67	*H.* ♂	Nephrosklerose, Emphysema pulm.	—	74	—	28	—	38	Harnmenge normal
68	*S.* ♀	Nephritis acut.	18. III.	58	—	8	—	14	Ödeme, Oligurie
69	*Z.*	Nephrosklerose	—	64	—	6	—	9	
70	*Sch.* ♀	Nephrosklerose	—	26	—	1	—	4	Polyurie, kein. Ödeme
71	*R.* ♂	Nephrose	—	78	—	25	—	32	Oligurie, starke Ödeme, Ödemresorption
72	*St.* ♀	Nephritis chron.	—	41	—	4	—	10	Leichte Ödeme
73	*M.* ♀	Nephrosklerose, Tabes. Mesaort. luica	—	18	—	1	—	5,5	Harnmenge normal
74	*H.* ♀	Nephrosklerose, Arteriosklerose, Diabetes mell.	17. IV.	24,5	11,2	4,6	45,7	18,7	Harnmenge normal
75	*H.* ♀	Nephrosklerose, Arteriosklerose, Diabetes mell.	21. VI.	35,28	28,8	—	81,6	—	Hochgradige Oligurie, Sekt.-Bef.: 3. VII. Nephrosklerose, Pancreasatrophie, Arteriosklerose der peripher. Arterien, Tuberc. pulm.
76	*P.* ♀	Nephrosklerose, Insuffizienz cord.	17. IV.	27,5	17,5	6,44	63,6	23,4	Oligurie hochgradig, Ödeme

III. Nierenkranke mit oder ohne Herzinsuffizienz. (Fortsetzung.)

Nr.	Fall	Diagnose	Datum	R-N	U+-N	D-N	Proz. d. R-N U+-N Proz.	D-N Proz.	Bemerkungen
77	*P.* ♀	Nephrosklerose, Insuffizienz cord.	19. IV.	53	32,9	—	62	—	Anstieg der Diurese
78	*R.* ♂	Nephrosklerose	18. IV.	33,7	—	12,3	—	36,4	Oligurie, leichte Ödeme
79	*R.* ♂	Nephrosklerose	30. IV.	35,28	28,28	—	80	—	Diurese reichlich, Ödeme i. Rückgang
80	*K.*	Maligne Nephrosklerose, Lues	19. III.	44,8	38,8	—	86,5	—	Polyurie, Ödeme gering
81	*Z.* ♀	Nephritis chron., Vitium cord.	20. IV.	16,8	15,9	6,6	95	39,7	Keine Ödeme
82	*Z.* ♀	Nephritis chron., Vitium cord.	1. VI.	36,4	35	—	96	—	Keine Ödeme, Harnmenge normal
83	*N.* ♀	Nephrosklerose, Gangraena pedis	28. IV.	27,5	17,5	7,63	63,5	27,7	Oligurie, Ödeme, Sekt.-Bef. 11. V. Nephrosklerose, Leberatrophie
84	*V.* ♀	Nephrosklerose, Insuffizienz aortae, Lues aortae	23. IV.	24,5	12,88	—	52	—	Einsetzende Polyurie, Ödeme
85	*V.* ♀	Nephrosklerose, Insuffizienz aortae, Lues aortae	11. V.	36,4	25,2	—	69	—	Diurese geringer, Gewicht gleich
86	*V.* ♀	Nephrosklerose, Insuffizienz aortae, Lues aortae	1. VI.	32,2	32,2	—	100	—	Oligurie, Gewichtszunahme
87	*K.* ♀	Nephrosklerose	23. IV.	24,5	8,26	—	33,7	—	Keine Ödeme
88	*Ch.* ♀	Nephrosklerose	24. IV.	38,3	23,8	—	62	—	Harnmenge normal, keine Ödeme
89	*B.* ♂	Nephritis chron.	23. IV.	47,6	23,8	—	50	—	Harnmenge normal, keine Ödeme
90	*K.* ♂	Nephrosklerose	24. V.	35,28	23,8	6,18	67,4	17,5	Mäßiggrad. Hydrops, Ödemresorption, Polyurie
91	*K.* ♂	Nephrosklerose	19. V.	50,4	50,4	—	100	—	Harnmenge gering, Zunahme des Hydrops
92	*K.* ♂	Nephrosklerose	13. VI.	49,4	20,19	—	40,8	—	Harnmenge reichlich, Ödementwässerung, Sekt.-Bef.: 13. VII. Maligne Nephrosklerose, Coronarsklerose
93	*Ch.* ♂	Nephrosklerose, Alkoholismus	24. V	47	28,28	—	60,1	—	Viel Harn, keine Ödeme
94	*M.* ♀	Nephrosklerose, Vitium cord.	27. IV.	24,5	22,12	—	90,2	—	Mäßige Oligurie, leichte Ödeme
95	*F.* ♂	Nephrosklerose, Pneumonie	2. V.	41,4	35	—	84,4	—	Oligurie, Ödeme, Sekt.-Bef.: 3. V. Nephrosklerose, Pneumonie
96	*Z.* ♂	Nephritis chron.	5. V.	77	56	—	72,7	—	Polyurie, kein. Ödeme
97	*Z.* ♂	Nephritis chron.	13. VI.	76,5	47,9	—	62,6	—	Polyurie, kein. Ödeme
98	*Z.* ♂	Nephritis chron.	—	53	31,2	—	58,7	—	Polyurie, kein. Ödeme
99	*Sch.* ♀	Nephrosklerose, Vitium cord.	14. V.	36,4	36,4	—	100	—	Ödeme, Oligurie
100	*Sch.* ♀	Nephrosklerose, Vitium cord.	29 V.	53,2	47,6	—	89	—	Polyurie, Ödemresorption
101	*C.* ♀	Nephrosklerose, Hemiplegie	25. V.	40,6	37,8	—	93	—	Hochgradige Oligurie, mäßige Ödeme
102	*C.* ♀	Nephrosklerose, Hemiplegie	6. VI.	37,8	28,0	—	74	—	Reichliche Diurese, keine Ödeme
103	*P.* ♂	Nephrosklerose, Hemiplegie	19. V.	39,2	19,6	—	50	—	Leichte Ödeme, Polyurie, Ödemresorption
104	*St.* ♂	Nephrosklerose	17. V.	42	29,4	—	70	—	Keine Ödeme, gute Nierenfunktion, Harnmenge normal
105	*V.* ♀	Nephrosklerose	30. V.	43,45	22,34	—	51,4	—	Normalfall
106	*St.* ♀	Nephrosklerose, Insuff. valv. mitralis	24. V.	28	—	—	100	—	Gering. Herabsetzung der Harnmenge

III. Nierenkranke mit oder ohne Herzinsuffizienz. (Fortsetzung.)

Nr.	Fall	Diagnose	Datum	R·N	U+·N	D·N	Proz. d. R·N U+·N Proz.	Proz. d. R·N D·N Proz.	Bemerkungen
107	*St.* ♀	Nephrosklerose, Insuff. valv. mitralis	2. VII.	27	20,97	—	77,5	—	Gewichtsabnahme, Polyurie
108	*T.* ♀	Nephritis acut.	4. VI.	54,6	46,2	—	84	—	Keine Ödeme, Harnmenge normal
109	*R.* ♀	Nephrosklerose	8. VI.	37,1	36,6	—	98,7	—	Leichte Ödeme
110	*J.* ♀	Nephritis chron.	22. VI.	47,02	31,16	—	66,2	—	Leichte Ödeme, Oligurie
111	*J.* ♀	Nephritis chron.	26. VI.	58,02	22,34	—	38,5	—	Kein Ödeme, Polyurie (Hyposthenurie)
112	*Ph.* ♂	Nephrosklerose, Coronarsklerose	23. VI.	36,46	18,13	—	49,7	—	Leichte Ödeme, Polyurie, Entwässerung
113	*K.* ♀	Angiospasmen	15. VI.	22,44	10,6	—	47,1	—	Keine Ödeme, keine Oligurie
114	*X.*	Nephritis acut.	13. VI.	31,82	22,9	—	72	—	Leichte Ödeme
115	*L.* ♀	Nephrosklerose, Tab. dors.	12. VI.	35,38	17,84	—	50,5	—	Harnmenge normal, keine Ödeme
116	*V.* ♀	Nephrosklerose	11. VI.	34,1	19,4	—	56,9	—	
117	*H.* ♀	Nephrosklerose	7. VI.	22,4	10,78	—	48,1	—	Harnmenge normal, keine Ödeme
118	*H.* ♂	Nephrosklerose, Hemiplegie	6. VI.	50,4	30,94	—	61,3	—	Harnmenge normal, keine Ödeme
119	*H.* ♂	Nephrosklerose, Hemiplegie	12. VI.	37,56	18,28	—	48	—	Harnmenge normal, keine Ödeme
120	*K.* ♀	Nephrosklerose	20. VI.	29,88	—	—	100	—	Keine Ödeme
121	*S.* ♀	Nephrosklerose, Hämorrhagia cerebri	19. VI.	44,69	28	—	62,6	—	Oligurie, geringe Ödeme
122	*S.* ♀	Nephrosklerose, Hämorrhagia cerebri	25. VI.	66,9	51,16	—	76	—	Oligurie, geringe Ödeme
123	*S.* ♀	Nephrosklerose, Hämorrhagia cerebri	2. VII.	91,34	65,66	—	71,8	—	Oligurie, geringe Ödeme
124	*S.* ♀	Nephrosklerose, Hämorrhagia cerebri	7. VII.	97,22	65,66	7,74	67,5	7,96	Oligurie, geringe Ödeme
125	*F.* ♀	Nephritis chron.	30. VI.	50,2	25,9	—	51,5	—	Oligurie, keine Ödeme
126	*K.* ♀	Nephrosklerose, Hemiplegie	—	28,201	—	3,5	—	12,4	Gute Nierenfunktion, keine Ödeme
127	*K.* ♀	Nephrose, Acromegalie	2. VII.	35	16,28	—	46,5	—	Ödeme, keine Oligurie
128	*Sch.* ♀	Nephritis chron.	3. VII.	53,7	45,668	—	85	—	Harnmenge normal, keine Ödeme. Niereninsuffizienz
		IV. Nierenkranke mit hochgradiger Niereninsuffizienz (echte Urämie).							
129	*C.* ♂	Nephritis subacut, präurämisch	22. XII.	209,5	—	12,38	—	5,9	Ödeme, stark. Oligurie. Sekt.-Bef.: Große weiße Niere, subacut. Nephritis mit Blutungen
130	*S.* ♀	Nephritis subacut, Krampfurämie und echte Urämie	21. III.	159	—	35	—	22	Oligurie, Ödeme. Sekt.-Bef.: 22. III. Nephritis subacut. bunte Niere
131	*P.* ♀	Nephritis chron., sekund. Schrumpfniere	5. V. 22.	147	112	20	76,2	13,6	Polyurie, keine Ödeme
132	*P.* ♀	Nephritis chron., sekund. Schrumpfniere	10. I.	189	162	—	85,6	—	Oligurie, hochgradig. Mattigkeit, Brechreiz
133	*P.* ♀	Nephritis chron., sekund. Schrumpfniere, Coma	14. I.	200,2	124,6	—	62	—	Oligurie hochgradig, Kußmaulsches Atmen, Coma, Sekt.-Bef.: 17. I. Sekund. Schrumpfniere (RN 1920, März 112, 1920 3. V. 90)

IV. Nierenkranke mit hochgradiger Niereninsuffizienz (echte Urämie).
(Fortsetzung.)

Nr.	Fall	Diagnose	Datum	R-N	U+-N	D-N	Proz. d. R-N U+-N Proz.	Proz. d. R-N D-N Proz.	Bemerkungen
134	*B.* ♂	Nephritis acut., Krampfurämie und echte Urämie	11. X.	121,5	—	37	—	30,4	Oligurie, mächtige Ödeme, starke Hypertonie
135	*Z.* ♂	Nephrosklerose. echt. Urämie, Koma	17. I.	285	128,8	—	45	—	Sekt.-Bef.: 8. I. Nephrosklerose
136	*M.* ♀	Tuberk. der Nieren	26. II.	145,6	138,6	—	95	—	Oligurie, keine Ödeme
137	*M.* ♀	Tuberk der Nieren	9. III.	330,7	147	—	44	—	Coma, echte Urämie
138	*X.*	Anurie, Schrumpfniere, echte Urämie	31. III.	225	120,4	—	53,6	—	
139	*B.* ♀	Nephritis acut.	28. VI.	107	—	9	—	8,4	Keine Urämie, Oligurie, leichte Ödeme
140	*H.* ♀	Nephritis chron., Vitium cord., (Aorteninsuffiz.)	1. V.	93,8	79,8	—	85	—	Oligurie mäßig, Ödeme gering, Niereninsuffizienz
141	*H.* ♀	Nephritis chron., Vitium cord., (Aorteninsuffiz.)	9. V.	106,4	75,6	—	71,7	—	Leichter Diureseanstieg, Ödeme geringer
142	*H.* ♀	Nephritis chron., Vitium cord., (Urämie)	18. V.	133	70	—	52,6	—	Hochgradige Oligurie, Ödeme stärker, Coma, Sekt.-Bef.: 19. V. Glatte Schrumpfniere, Insuffizienz d. Aorta mitralis u. Myodeg. cordis, Anämie
143	*V.* ♀	Amyloidschrumpfniere, Tuberc. pulm.	18. V.	53,2	30,8	—	57,9	—	Harnmenge normal, geringe Ödeme
144	*V.* ♀	Amyloidschrumpfniere, Tuberc. pulm.	2. VII.	252,5	164,4	—	65,1	—	Anurie, Ödeme stärk., Sekt.-Bef.: 3. VII. Amyloidschrumpfniere, Tuberc. pulm., Niereninsuffizienz
145	*P.* ♂	Echte Urämie	25. VI.	112,3	52,5	—	46,7	—	Sekt.-Bef.: 25. VI. Tuberkulose der Niere

Untersuchungen über die Wirkung des Thyroxins.

III. Mitteilung.

Über die Zerstörung der spezifischen Wirkung des Thyroxins durch die Einwirkung von Blut in vivo und in vitro[1].

Von

Benno Romeis.

(Aus dem histologisch-embryologischen Institut der Universität München.)

(Eingegangen am 30. Juli 1923.)

Mit 8 Abbildungen im Text.

In vorausgehenden Untersuchungen[2]) erbrachte ich den Nachweis, daß das Thyroxin auch in sehr starker Verdünnung bei Froschlarven noch die charakteristischen, unter der Bezeichnung „Schilddrüseneffekt" zusammenzufassenden Veränderungen hervorruft. Die Grenzdosis, bei der der typische Symptomenkomplex zum Vorschein kommt, wird unter anderem nicht nur durch die Höhe der Konzentration, sondern auch durch die Zahl der Einwirkungen, die Zahl der Tiere, wie die zur Verwendung kommende Flüssigkeitsmenge bestimmt. Bei einer Konzentration von 1 : 100000000 läßt sich der Schilddrüsenaffekt durch die drei- bis viermalige 24stündige Einwirkung von je 500 ccm Lösung erzielen. Konzentrationen von 1 : 1000000 bis 1 : 30000000 haben auch nach *einmaliger*, 24- bis 48stündiger Einwirkung die typischen Veränderungen zur Folge. Eine sich in physiologischen Grenzen haltende Reizwirkung läßt sich bei dauernder Einwirkung der Lösungen selbst bei einem Verdünnungsgrad von 1 : 5000000000 deutlich beobachten. Nach diesen Feststellungen war es naheliegend, den Kaulquappenversuch gewissermaßen als biologischen Indikator für die Anwesenheit von Thyroxin zu benutzen um mit seiner Hilfe die Frage zu untersuchen, wie lange sich das Thyroxin nach intravenöser Injektion im Blute noch nachweisen läßt. Es liegt

---

[1]) Ausgeführt mit Unterstützung der Notgemeinschaft Deutscher Wissenschaft.

[2]) *B. Romeis*, Klin. Wochenschr., Jahrg. 1, Nr. 25, 1922; diese Zeitschr. 141, 121, 1923.

auf der Hand, daß diese biologische Methode chemischen Methoden, die etwa auf dem Jodnachweis fußen, weitaus überlegen ist, zumal zurzeit noch keine charakteristische chemische Reaktion von entsprechender Feinheit zum Nachweis des Thyroxins bekannt ist.

Zunächst sei in kurz gedrängter Form ein Auszug aus den Versuchsprotokollen gegeben.

Versuch 588.

A. Gewinnung des Versuchsmaterials.

Zwei ziemlich gleich großen männlichen Kaninchen des gleichen Wurfes (Nr. 1: 900 g; Nr. 2: 930 g) werden am 29. Mai 1922 10 Uhr vormittags in leichter Äthernarkose je 1 mg Thyroxin in die linke Herzkammer eingespritzt. Ein drittes Tier des gleichen Wurfes (Nr. 3: 950 g) dient als Kontrolle. Das Thyroxin wird zur Injektion in je 10 ccm einer 0,9 proz. sterilen Kochsalzlösung durch Zusatz einiger Tropfen einer n/10 NaOH klar gelöst. Während der Injektion tritt nach etwa 4 ccm Zunahme der Puls- und Atemfrequenz ein, die jedoch nach 5 bis 10 Minuten wieder abklingt. Kurze Zeit nach der Injektion zeigen die Tiere, die bald aus der Narkose erwachen, wieder normales Verhalten. Nach Ablauf von 5 Stunden, während welcher das Tier zur Gewinnung des Urins zweimal katheterisiert wird, wird bei Kaninchen Nr. 1 in Äthernarkose die Art. carotis com. sin. freigelegt, peripher unterbunden, zentral abgeklemmt, dann durchschnitten und zur sterilen Entnahme von 2 × 10 ccm Blut geöffnet (Blutprobe Nr. 1). Es fällt auf, daß das Blut sehr rasch gerinnt. Nach Abbinden der Arterie Verschluß der Wunde durch Naht. Hierauf wird das Tier nochmals katheterisiert, die gewonnenen Urinproben werden vereinigt (Urinprobe Nr. 1). Eine halbe Stunde nach der Blutentnahme stirbt das Tier, anscheinend infolge zu starken Blutverlustes. Bei der Sektion ergeben sich außer starker Anämie der Organe keine Veränderungen. Leber, Gallenblase und Milz werden für den nachfolgenden Versuch entnommen.

Am 30. Mai 1922 werden 24 Stunden nach der Injektion in gleicher Weise dem Kaninchen Nr. 2 aus der Art. carot. 12 ccm Blut abgezapft (Blutprobe Nr. 2), ebenso Urin (Urinprobe Nr. 2). Kurze Zeit nach der Operation ist das Tier wieder munter. Es stirbt 14 Tage später (14. Juni) plötzlich ohne erkennbare Ursache. Das Gewicht ist nicht wesentlich verändert (920 g). Die Wunde ist per primam vernarbt. Die Organe der Brusthöhle zeigen keine Veränderung; nur die Thymus ist auffallend stark reduziert. Das Bauchfell ist von normaler Beschaffenheit, ebenso Darm- und Urogenitaltraktus. Die Milz ist sehr klein, die Leber dunkel gefärbt. Die Nebennieren erscheinen etwas schlaff.

Auch dem zur Kontrolle dienenden Kaninchen Nr. 3 werden am 30. Mai 1922 in obiger Weise aus der Halsschlagader 12 ccm Blut und aus der Harnblase Urin entnommen. Es übersteht den Eingriff ohne Folgeerscheinungen (Blutprobe Nr. 3; Urinprobe Nr. 3).

B. Ausführung des Versuches.

Versuchstiere: Rana temporaria-Larven aus einem am 14. April 1922 abgelegten Laichballen.

Beginn des Versuches: 29. bzw. 30. Mai 1922. Alter der Tiere 45 bzw. 46 Tage.

Durchschnittsgröße: Gesamtlänge 25 mm; Rumpflänge 9,5 mm; Rumpfbreite 6,3 mm.

Entwicklungsstadium: kräftige, vollentwickelte Larven mit 1 bis 1,5 mm langen Extremitätenanlagen.

Anzahl der Tiere: 10 Gruppen zu je 10 Kaulquappen. Wassermenge in den einzelnen Schalen: 500 ccm.

Versuchsanordnung.

Gruppe a: Kontrolle.
„ b: Thyroxin 1:10000000.
„ c: Blutprobe Nr. 1 10 ccm }
„ d: Urinprobe Nr. 1 }
„ e: Leber mit Gallenblase }
„ f: Milz } von Kaninchen Nr. 1 5 Stunden nach der Einspritzung von 1 mg Thyroxin.

Dazu kommen am 30. Mai noch folgende Gruppen:

Gruppe g: Blutprobe Nr. 2 }
„ h: Urinprobe Nr. 2 } von Kaninchen Nr. 2; 24 Stunden nach Einspritzung von 1 mg Thyroxin.
„ i: Blutprobe Nr. 3 }
„ k: Urinprobe Nr. 3 } von normalem Kontrollkaninchen Nr. 3.

Verlauf des Versuchs:

Am 31. Mai wird das Wasser sämtlicher Schalen erneuert. Die Tiere in Gruppe a, b, d, h und k werden mit kleinen Stückchen normaler Leber gefüttert, Gruppe c, g und i erhalten die Reste des Blutgerinnsels, Gruppe e

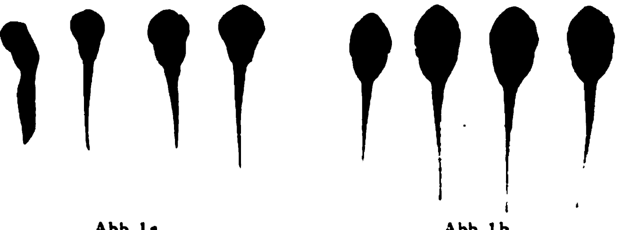


Abb. 1a. Abb. 1b.

und f die noch vorhandene Leber und Milzreste von Kaninchen Nr. 1. Am 1. Juni erfolgt neuerdings Wasserwechsel. Gruppe b kommt nochmals für 24 Stunden in Thyroxinlösung der angegebenen Konzentration, Gruppe c erhält den Rest der Blutprobe Nr. 1 (10 ccm), e und f nochmals Leber bzw. Milz von Kaninchen Nr. 1, die ebenso wie das Blut bis zu diesem Tag im Eisschrank steril aufbewahrt wurden.

Am 2. Juni wird in sämtlichen Schalen neuerdings das Wasser gewechselt. Von jetzt ab werden alle Gruppen gleichmäßig nur mehr mit Froschmuskel und Pflanzen gefüttert. In der Thyroxingruppe b ist Entwicklungsbeschleunigung und Verkürzung der Darmspirale festzustellen. Die übrigen zeigen keine Veränderung. Zwei Tage später, am 4. Juni, hat der Abbau der larvalen Organe in Gruppe b schon starke Fortschritte gemacht. Die Hornkiefer sind abgeworfen, der Schädel froschähnlich, der Ruderschwanz stark eingeschmolzen, die Entwicklung der Extremitäten dagegen beschleunigt (vgl. Abb. 1a). In der Gruppe c und g, in welchen ebenfalls das Auftreten von Schilddrüsensymptomen zu erwarten wäre, ist nicht der geringste Einfluß zu erkennen (als Beispiel für diese und die übrigen Gruppen diene Abb. 1b: Gruppe c).

In den folgenden Tagen (6., 7., 9., 10. Juni) metamorphosieren sechs Tiere der Gruppe b. Bei den übrigen Tieren dieser Gruppe brechen die Vorderbeine noch bis zum 14. Juni 1922 durch. Wie ein Vergleich von Abb. 2b mit den in Abb. 2a wiedergegebenen Tieren der Kontrollgruppe ohne weiteres erkennen läßt, ist die Entwicklung in Gruppe b stark beschleunigt, während die Größenmaße seit dem 4. Juni noch weiter

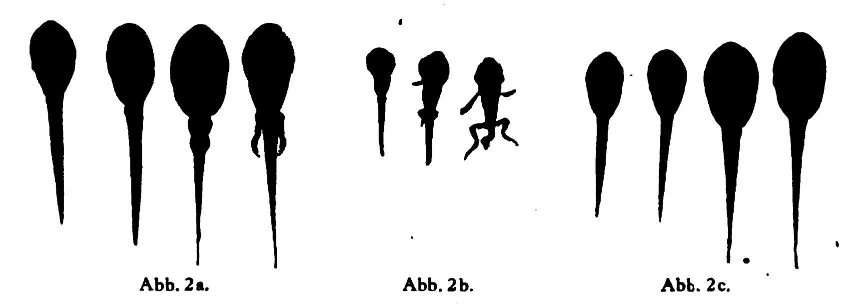


Abb. 2a. Abb. 2b. Abb. 2c.

stark zurückgegangen sind. In den übrigen Gruppen stimmt Wachstum und Entwicklung mit jenen der Gruppe a so sehr überein, daß auf eine Wiedergabe der Photographien verzichtet werden kann. Nur in Gruppe f, die mit der Milz des Thyroxinkaninchens Nr. 1 gefüttert wurde, ist auffallenderweise Entwicklung wie Wachstum deutlich gehemmt (vgl. Abb. 2c).

Am 18. Juni wird der Versuch, ohne daß sich am Befunde etwas wesentlich geändert hätte, abgebrochen.

Ergebnis des Versuches 588.

Das 5 bzw. 24 Stunden nach der intrakardialen Einspritzung von Thyroxin (1 mg auf etwa 900 g Körpergewicht) entnommene Blut von Kaninchen ist im Kaulquappenversuche ohne spezifische Wirkung. In gleicher Weise erwiesen sich Urin, Galle und Lebergewebe der Thyroxinkaninchen als spezifisch unwirksam. Die Verfütterung der Milz des Thyroxinkaninchens Nr. 1 hatte Wachstumshemmung und Entwicklungshemmung zur Folge.

Versuch 598.

A. Gewinnung des Versuchsmaterials.

Einem Kaninchen (Nr. 4: 900 g) wird am 22. Juni 1922 wie im vorausgehenden Versuch 1 mg Thyroxin in die Ohrvene injiziert. Nach Ablauf einer Stunde werden in Narkose aus der Art. carot. 12 ccm Blut entnommen (Blutprobe Nr. 4). Hierauf Unterbindung, Naht usw. In gleicher Weise werden zwei Meerschweinchen (Nr. 1: 320 g; Nr. 2: 350 g) je 1 mg Thyroxin intrakardial verabreicht. Meerschweinchen Nr. 1 wird 1 Stunde, Meerschweinchen Nr. 2 6 Stunden nach der Einspritzung durch Öffnen der Vena jugularis entblutet (Blutprobe Nr. 5 und 6). Außerdem wird die Milz beider Tiere zur Verfütterung verwendet. Einem dritten Meerschweinchen (Nr. 3: 370 g) wird 1 mg Thyroxin (gelöst in 10 ccm 0,9proz. NaCl + NaOH) in den rechten Pleuralraum injiziert. Nach 6 Stunden wird der Brustkorb des narkotisierten Tieres geöffnet und die in der rechten Pleurahöhle befindliche Flüssigkeit unter Vermeidung von Blutbeimengung entnommen.

B. Ausführung des Versuchs:

Versuchstiere: Rana temporaria-Larven aus einem am 20. April 1922 abgelegten Laichballen.

Beginn des Versuches: 22. Juni 1922 bzw. 23. Juni 1922. Alter der Tiere: 64 (65) Tage.

Durchschnittsgröße: Gesamtlänge: 29,0 mm; Rumpflänge: 10,5 mm; Rumpfbreite: 7,0 mm.

Entwicklungsstadium: kräftige, noch typisch larval ausgebildete Kaulquappen mit 2 bis 4 mm langen Extremitätenanlagen.

Anzahl der Tiere: 8 Gruppen zu je 8 Froschlarven. Wassermenge: je 500 ccm.

Versuchsanordnung:

Gruppe a: Kontrolle.
,, b: Thyroxin 1:10000000.
,, c: Blutprobe Nr. 4 (Thyroxinkaninchen Nr. 4; 1 Stunde nach intravenöser Injektion.
,, d: Blutprobe Nr. 5 } Thyroxinmeerschweinchen Nr. 1;
,, e: Milz } 6 Stunden nach intrakardialer Injektion.
,, f: Pleuraflüssigkeit Nr. 1 von Thyroxinmeerschweichen Nr. 3.

Dazu kommen am 23. Juni:

Gruppe g: Blutprobe Nr. 6 } Thyroxinmeerschweinchen Nr. 2;
,, h: Milz } 24 Std. nach intrakardialer Injektion.

Verlauf des Versuchs:

Am 24. Juni wird in sämtlichen Gruppen das Wasser gewechselt. In Gruppe c sind zwei Tiere tot, in Gruppe f eins. — 26. Juni Wasserwechsel.

27. Juni. In Gruppe b ist deutliche Schilddrüsenwirkung festzustellen (Tiere kleiner, Schwanz- und Darmreduktion, Hornkiefer abgeworfen). Auch in Gruppe f haben zwei Tiere die Hornkiefer abgeworfen. Das Wachstum der Tiere ist in dieser Gruppe ebenfalls deutlich zurückgeblieben. In den übrigen Gruppen lassen sich gegenüber den Kontrollarven dagegen keine Unterschiede erkennen.

29. Juni. In Gruppe b und f haben sich die Thyreoideaerscheinungen verstärkt, und zwar in b mehr als in f. In ersterer ist ein Tier tot; vordere Extremitäten vor dem Durchbruch.

2. Juli. Die Tiere in Gruppe b zeigen voll ausgeprägten Schilddrüseneffekt mit starken Reduktionserscheinungen. In Gruppe f treten letztere erst schwächer hervor; dafür ist die Entwicklungsbeschleunigung in dieser Gruppe stärker ausgeprägt. Die Extremitäten sind größer als in Gruppe b. Was die Körpergröße betrifft, so nehmen die Tiere der letztgenannten Gruppe die unterste Stufe ein, dann folgen die der Gruppe f. Die Gruppen c, d und e stimmen hinsichtlich Wachstum und Entwicklung mit der Kontrollgruppe überein, während die Tiere der Gruppe h in ihrer Entwicklung deutlich gehemmt sind. Auch in Gruppe g ist eine leichte Verzögerung zu bemerken.

Bis zum 4. Juli sind bei sämtlichen Tieren der Gruppen b und f die Vorderbeine durchgebrochen. Am 12. Juli metamorphosieren die letzten Tiere der Gruppen a, c und e, während in Gruppe d noch fünf, in Gruppe g noch sechs und in Gruppe h noch sieben neotenische Larven vorhanden sind.

Ergebnis des Versuchs 593.

Das 1 Stunde nach der intravenösen Injektion von Thyroxin (1 mg auf 950 g Körpergewicht) einem Kaninchen entnommene Blut ruft im Kaulquappenversuch keine spezifische Wirkung hervor. Das Blut von Meerschweinchen wirkt 6 bzw. 24 Stunden nach der intrakardialen Thyroxineinspritzung eher entwicklungshemmend als entwicklungsbeschleunigend. Das Wachstum wird nicht beeinflußt. Die Verfütterung der Milz verursachte in einem Falle (Entnahme 24 Stunden nach der Injektion) Entwicklungshemmung. Die 6 Stunden nach der Injektion von 1 mg Thyroxin (gelöst in 10 ccm 0,9proz. NaCl + NaOH) in den Pleuralraum entnommene Pleuralflüssigkeit wirkte deutlich entwicklungsbeschleunigend. Ihre dissimilationssteigernde Wirkung war jedoch schwächer als die einer gleich starken Thyroxinlösung.

Versuch 594.

A. Gewinnung des Versuchsmaterials:

Dem Kaninchen Nr. 4, das am 22. Juni zum erstenmal 1 mg Thyroxin in die Ohrvene eingespritzt erhielt, wird am 29. Juni nochmals 1 mg Thyroxin intravenös injiziert. Nach Ablauf einer Stunde werden dem Tier wieder 10 ccm Blut aus der Art. carot. commun. dextra entnommen (Blutprobe Nr. 7). Das Kaninchen übersteht Injektion und Entnahme ohne wahrnehmbare Folgeerscheinungen.

B. Ausführung des Versuchs:

Versuchstiere: Rana temporaria-Larven aus einem am 20. April 1922 abgelegten Laichballen.

Beginn des Versuchs: 29. Juni. Alter der Tiere: 71 Tage.

Durchschnittsgröße: Gesamtlänge: 27,5 mm; Rumpflänge 10,3 mm; Rumpfbreite: 6,8 mm.

Entwicklungsstadium: kräftig entwickelte, noch völlig larval ausgebildete Kaulquappen mit 1 bis 2 mm langen, in Oberschenkel, Unterschenkel und Fußplatte gegliederten Hinterbeinen.

Anzahl der Tiere: drei Gruppen zu je acht Kaulquappen. Wassermenge in den einzelnen Schalen: 500 ccm.

Versuchsanordnung:

Gruppe a: Kontrolle.
,, b: Thyroxin 1:10000000.
,, c: Blutprobe Nr. 7 von Thyroxinkaninchen Nr. 4, 1 Stunde nach der zweiten Injektion.

Verlauf des Versuchs:

30. Juni. Wasserwechsel. In Gruppe c werden die Reste des Blutkuchens wieder mit in das frische Wasser übertragen. — 2. Juli. Wasserwechsel. In Gruppe b deutliche Thyroxinwirkung. — 3. Juli. In Gruppe b

haben alle Tiere die Hornkiefer abgeworfen. Reduktionserscheinungen am Ruderschwanz. — 5. Juli. In Gruppe b hochgradiger Schilddrüseneffekt (vgl. Abb. 3b). Bei einem der Tiere liegen beide Vorderbeine frei, bei zweien

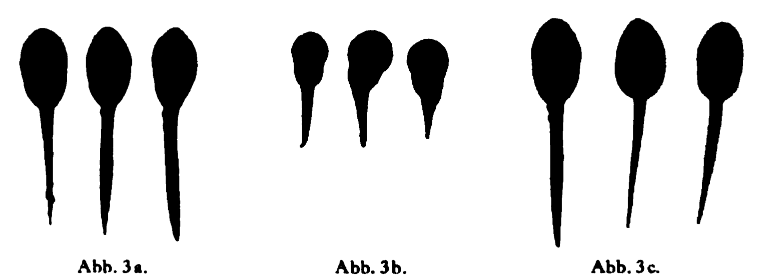


Abb. 3a. Abb. 3b. Abb. 3c.

je ein linkes; drei der Larven sind tot. Im Gegensatz dazu ist in Gruppe c nicht die geringste Schilddrüsenwirkung festzustellen (vgl. Abb. 3 c). Die Tiere sind durchschnittlich sogar etwas größer als die Kaulquappen der Gruppe a (vgl. Abb. 3a).

6. Juli. In Gruppe b sind alle noch vorhandenen Tiere tot.

20. Juli. Zwischen Gruppe a und c ist weder im Wachstum noch in der Differenzierung der Extremitäten und Organe ein Unterschied zu erkennen. Abbruch des Versuchs.

Ergebnis des Versuchs 594.

Einem Kaninchen werden bei mehrtägigem Zwischenraum zweimal 1 mg Thyroxin in Lösung intravenös injiziert. Das 1 Stunde nach der zweiten Injektion entnommene Blut hat im Kaulquappenversuche keinen spezifischen Einfluß auf Wachstum und Entwicklung.

Diese im vergangenen Jahre an Kaninchen und Meerschweinchen durchgeführten Versuche wurden nun durch eine Reihe diesjähriger Versuche, zu welchen vor allem Ratten dienten, bestätigt und ergänzt.

Versuch 611.

A. Gewinnung des Versuchsmaterials:

Am 19. Mai 1923 werden sechs 67tägige Ratten des gleichen Wurfes von 120 bis 130 g Körpergewicht je 1 ccm einer Thyroxinlösung, die in diesem wie in den nachfolgenden Versuchen durch Lösen von 10 mg Thyroxin in 10 ccm steriler 0,9proz. NaCl-Lösung unter Zusatz von einigen Tropfen n/1 NaOH hergestellt wurde, in die Schwanzvene injiziert. Hierauf werden die einzelnen Tiere in bestimmten Zeitabschnitten in Narkose durch Öffnen der Halsgefäße unter leichtem Kneten des Körpers in ein steriles Gläschen entblutet. Im einzelnen werden dadurch folgende Blutproben erhalten: Blutprobe Nr. 8: 5 Minuten; Blutprobe Nr. 9: 30 Minuten; Blutprobe Nr. 10: 60 Minuten; Blutprobe Nr. 11: 1½ Stunden; Blutprobe Nr. 12: 2 Stunden nach Einspritzung. — Dem Blute einer weiteren Ratte des gleichen Wurfes, das dem Tier ohne vorhergehende Einspritzung entnommen wurde, wird 1 mg Thyroxin, gelöst in 1 ccm schwach alkalischer 0,9proz. NaCl-Lösung, zugesetzt. Nach kurzem Umrühren bleibt die Mischung bei Zimmer-

temperatur stehen. Nach Ablauf von 5 Minuten wird sie als Blutprobe 13 zum Versuch verwendet. Endlich wird noch das Blut einer Ratte ohne weiteren Zusatz für die Kontrollgruppe verwendet (Blutprobe 14).

B. Ausführung des Versuchs:

Versuchstiere: Rana temporaria-Larven aus einem am 10. III. 23. in Marquartstein geholten Laichballen (Urmundstadium).

Beginn des Versuchs: 19. Mai 1923. Alter der Tiere etwa 41 Tage.

Durchschnittsgröße: Gesamtlänge: 24 mm; Rumpflänge: 9,0 mm; Rumpfbreite: 5,0 mm.

Entwicklungsstadium: kleine, kräftige Kaulquappen, deren Extremitätenanlagen mit freiem Auge noch kaum erkennbar sind.

Anzahl der Tiere: neun Gruppen zu je zehn Larven. Wassermenge bei Einwirkung der Lösungen je 200 ccm; später je 800 ccm.

Versuchsanordnung:

Gruppe a: Kontrolle; Leber + Blutprobe Nr. 14.
„ b: Blutprobe Nr. 8: 5 Minuten nach Injektion.
„ c: „ Nr. 9: 30 Minuten nach Injektion.
„ d: „ Nr. 10: 60 Minuten nach Injektion.
„ e: „ Nr. 13: frisches Blut + 1 mg Thyroxin in Lösung.
„ f: 1 mg Thyroxin in Lösung.
„ g: Blutprobe Nr. 11: 90 Minuten nach Injektion.
„ h: „ Nr. 12: 120 Minuten nach Injektion.
„ i: 1,5 mg Thyroxin in Lösung.

Verlauf des Versuchs 611.

20. Mai. 24 Stunden nach Versuchsbeginn wird in jeder Schale das Wasser gewechselt. Sämtliche Gruppen werden von jetzt ab mit Muskel und Pflanzen gefüttert.

23. Mai. In Gruppe i, f und e ist das Wachstum der Tiere etwas zurückgeblieben.

24. Mai. Starke Verschmälerung des Rumpfes in den genannten Gruppen. Einschmelzungen an Flossensäumen und Schwanzspitzen, am stärksten in Gruppe i; die Extremitätenanlagen sind größer als in der Kontrollgruppe. Die übrigen Gruppen zeigen dagegen keine derartigen Erscheinungen.

25. Mai. In den beiden Thyroxingruppen i und f sehr starker Schilddrüseneffekt: weitgehende Einschmelzung des Schwanzes, Reduktion der Darmspirale, völliger Verlust der larvalen Freßwerkzeuge, Ödeme in der Unterkiefergegend (vgl. Abb. 4d). In Gruppe e ist ebenfalls deutliche Schilddrüsenwirkung vorhanden. Dieselbe ist jedoch, wie ein Vergleich der ebengenannten Abbildung mit Abb. 11c überzeugend lehrt, ganz erheblich schwächer. Die Entwicklung der Extremitäten ist in den Gruppen e, f und i beschleunigt. Gruppe b zeigt gegenüber der Kontrollgruppe (vgl. Abb. 4b und a), abgesehen von einer aus den Photographien nicht ersichtlichen leichten Förderung der Extremitätenentwicklung und einer geringen Begünstigung des Körperwachstums, keinen nennenswerten Unterschied. Die übrigen Gruppen stimmen mit der Kontrollgruppe völlig überein.

Bis zum 26. Mai haben sich die Schilddrüsensymptome in Gruppe i und f noch extrem verstärkt. Am Nachmittag sterben in beiden Gruppen je zwei Tiere. Die übrigen, die ebenfalls sehr schwach sind, werden zur Untersuchung fixiert, ebenso zum Vergleich je zwei Tiere aus Gruppe a und b.

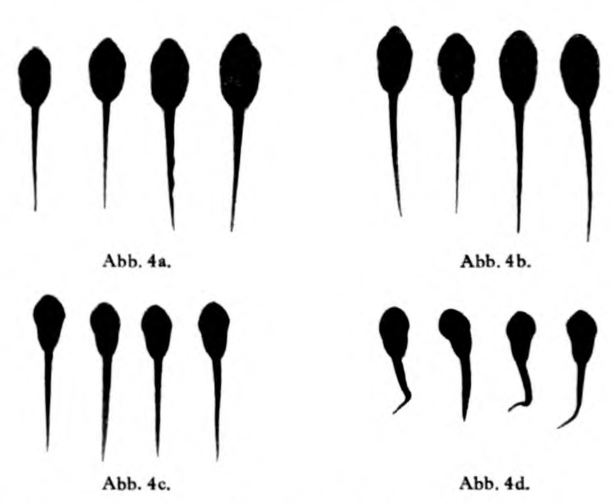


Abb. 4a. Abb. 4b.

Abb. 4c. Abb. 4d.

31. Mai. Keine weitere Zunahme der Veränderungen in Gruppe e. In Gruppe b sind die Tiere im Durchschnitt um 2 mm größer als in Gruppe a; im übrigen aber sind weder hier noch in den anderen Gruppen irgendwelche von der Kontrollgruppe abweichenden Befunde zu erheben.

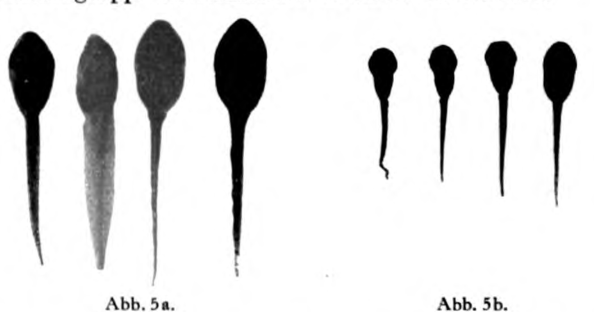


Abb. 5a. Abb. 5b.

2. Juni. Keine Veränderung. — 22. Juni. Wachstum und Entwicklung zeigen in Gruppe a, b, c, d, g und h keinen wesentlichen Unterschied. Es genügt daher zur Charakterisierung des Entwicklungsstandes dieser Gruppen in Abb. 5a die größten und kleinsten Tiere der Gruppe b wiederzugeben. Die Tiere der Gruppe e leben noch immer. Wie ein Vergleich von Abb. 5b mit 4c zeigt, sind die Tiere seit dem 25. Mai etwas gewachsen, die Thyreoideasymptome haben sich nicht mehr verstärkt. Den übrigen Gruppen gegenüber sind sie im Wachstum sehr stark zurückgeblieben.

Am 30. Juni wird der Versuch, ohne daß eine weitere Änderung eingetreten wäre, abgebrochen. Einzelne Kontrollarven und die Tiere der Gruppe e werden gewogen und fixiert. Die Gewichtszahlen geben den

beträchtlichen Größenunterschied sehr deutlich zu erkennen (Gruppe a: 200, 268, 285, 330 mg; Gruppe e: 29, 35, 40, 71 mg).

In Gruppe c und d zeigen je zwei Larven starke Verkrümmung der Hinterbeine. Doch ist es fraglich, ob ihr Auftreten durch die Versuchsbedingungen veranlaßt ist.

Ergebnis des Versuchs 611.

Einem Wurf halberwachsener, mittelgroßer Ratten wird je 1 mg Thyroxin in Lösung intravenös injiziert. Hierauf werden die Tiere in Abständen von 5, 10, 30, 60, 90 und 120 Minuten entblutet. Das auf diese Weise gewonnene Blut übt im Kaulquappenversuche keine spezifische Wirkung aus. Auch in vitro wird die spezifische Wirkung des Thyroxins durch die 5 Minuten lange Einwirkung von Rattenblut auf die Thyroxinlösung erheblich abgeschwächt.

Versuch 617.

A. Gewinnung des Versuchsmaterials:

Einer 135 g schweren 74 Tage alten Ratte, die am 19. Mai 1923 zum erstenmal 1 mg Thyroxin intravenös injiziert erhielt, wird am 26. Mai 1923 wiederum 1 mg Thyroxin (gelöst in 1 ccm einer schwach alkalischen 0,9proz. NaCl-Lösung) in die Schwanzvene eingespritzt. Nach Ablauf von 5 Minuten wird das Tier durch Öffnen der Halsgefäße entblutet (Blutprobe Nr. 14). — Weiterhin wird eine gleich schwere, nicht vorbehandelte Ratte des gleichen Wurfes entblutet, das steril gewonnene Blut mit 1 mg Thyroxin (in Lösung) und 10 ccm 0,9 proz. NaCl-Lösung versetzt. Nach 5 Minuten langem Verrühren mit einem Glasstab wird die Lösung mit einem Glasdeckel bedeckt und für eine Stunde bei Körpertemperatur in einen Thermostaten gestellt (Blutprobe Nr. 15).

B. Ausführung des Versuchs:

Versuchstiere: Rana temporaria-Larven der gleichen Herkunft wie in Versuch 611.

Beginn des Versuchs: 26. Mai 1923 6 Uhr nachmittags.

Durchschnittsgröße: Gesamtlänge: 26 mm; Rumpflänge: 9,0 mm; Rumpfbreite: 5,2 mm.

Entwicklungsstadium: Extremitätenanlagen mit freiem Auge als kleine weißliche Verdickungen eben erkennbar.

Anzahl der Tiere: vier Gruppen zu je zehn Larven. Wassermenge bei Einwirkung der Lösungen je 200 ccm; später je 800 ccm.

Versuchsanordnung:

Gruppe a: Kontrolle.
„ b: Blutprobe Nr. 14 (5 Minuten nach der zweiten Thyroxininjektion).
„ c: Blutprobe Nr. 15 (Blut + 1 mg Thyroxin in Lösung + 0,9 proz. NaCl; vor Verwendung 1 Stunde bei 37° C gehalten).
„ d: 1 mg Thyroxin in Lösung.

Verlauf des Versuchs:

Am 27. Mai. 10 Uhr morgens sind die Kaulquappen der Gruppe e außerordentlich schwächlich. Der Leib der Tiere ist kahnförmig eingezogen, der Rumpf nach rückwärts zugespitzt. Die Larven liegen zum Teil bewegungslos am Rücken. Im übrigen sind aber an den Tieren keine Reduktionserscheinungen festzustellen. Sie werden mit der Pipette in frisches Wasser übertragen, in dem sie sich, bis auf drei Tiere, die in den nächsten Stunden absterben, allmählich etwas erholen. Gleichzeitig erfolgt auch Wasserwechsel in Gruppe d. Die in Schale c befindliche Flüssigkeit wird in einem Erlenmeyerkolben ausgekocht; dabei färbt sich die zuerst schwarzrote Flüssigkeit olivgrün unter reichlicher Entstehung von Eiweißgerinnsel. Nach Abkühlen wird durch die trübe Flüssigkeit für mehrere Stunden Sauerstoff geleitet (*Blutprobe Nr. 16*). Dann werden neuerdings zehn Kaulquappen eingesetzt (*Gruppe e*). Am Abend — 24 Stunden nach Versuchsbeginn — wird auch in den Gruppen a und b, deren Tiere in ihrem Aussehen völlig übereinstimmen, das Wasser erneuert.

28. Mai. Wasserwechsel in sämtlichen Gruppen. Die Kaulquappen der Gruppe c haben sich wieder etwas gekräftigt, zeigen aber noch immer starke Einziehung der Bauchdecke. In Gruppe e keine Erscheinungen.

31. Mai. Sämtliche Tiere der Gruppe d haben die Hornkiefer abgeworfen. Am Schwanz beginnende Reduktion. In Gruppe b und c ist dagegen noch keine Thyroxinwirkung zu erkennen.



Abb. 6a. Abb. 6b. Abb. 6c.

1. Juni. Sämtliche Tiere der Gruppe d zeigen extreme Thyroxinwirkung (vgl. Abb. 6c), während sie in Gruppe c nur in beträchtlich geringerem Maße zum Vorschein kommt (Abb. 6b). Die Reduktionserscheinungen am Ruderschwanz sind hier noch sehr gering. Auch die Konfiguration des Kopfes, wie die Spiralform des Darmes ist in viel schwächerem Grade beeinflußt als in Gruppe d. Die geigenförmige Rumpfkontur der Larven wie auch der Verlust der Hornkiefer zeigen jedoch, daß die Wirkung des Thyroxins nicht völlig unterdrückt, sondern nur abgeschwächt ist. Noch geringer als in Gruppe c ist die Thyroxinwirkung in Gruppe e, deren Tiere außer einer leichten Einziehung des Rumpfes äußerlich nur eine Beschleunigung der Extremitätenentwicklung erkennen lassen. Die larvalen Freßwerkzeuge sind bei ihnen noch gut erhalten, doch ist zu berücksichtigen, daß in dieser Gruppe auch die Einwirkung erst später erfolgte. Gruppe b gleicht hinsichtlich ihres Wachstums und ihrer Entwicklung vollkommen den Kontrolltieren (Abb. 6a: Gruppe b).

2. Juni. In Gruppe d sind sämtliche Tiere infolge der starken Thyroxinwirkung abgestorben. In den übrigen Gruppen ist noch keine wesentliche Änderung festzustellen.

3. Juni. An den Larven der Gruppe c treten jetzt stärkere Abbauerscheinungen hervor. Die Darmspirale ist verkürzt, die Extremitätenentwicklung beschleunigt. Zwei Tiere der Gruppe sind tot. In Gruppe e kommt nunmehr ebenfalls eine stärkere Beeinflussung zum Durchbruch.

4. Juni. In Gruppe c ist auch der Rest der Tiere abgestorben.

6. Juni. Die Tiere der Gruppe e sterben im Laufe des Tages unter den charakteristischen Merkmalen starker Thyroxinwirkung ab. Zwischen Gruppe a und b besteht kein wesentlicher Unterschied.

7. Juli. Abbruch des Versuchs: Wachstum und Entwicklung der Kaulquappen von Gruppe a und b stimmt äußerlich vollkommen überein.

Ergebnis des Versuchs 617.

Einer Ratte werden in siebentägigem Zwischenraum zweimal je 1 mg Thyroxin in Lösung intravenös injiziert. Das 5 Minuten nach der zweiten Einspritzung entnommene Blut ist im Kaulquappenversuche ohne spezifische Wirkung. Durch die einstündige Einwirkung des mit 0,9proz. NaCl-Lösung verdünnten Blutes einer Ratte auf 1 mg Thyroxin in vitro wird dessen spezifische Wirkung auf Froschlarven herabgesetzt, aber nicht aufgehoben. Die Flüssigkeit wirkt auf Froschlarven toxisch; diese letztere Wirkung wird durch Kochen der Flüssigkeit stark abgeschwächt.

Versuch 618.

A. Gewinnung des Versuchsmaterials:

Am 28. Mai 1923 werden einer 140 g schweren, 76 Tage alten Ratte, die schon am 19. und 26. Mai je 1 mg Thyroxin intravenös injiziert erhielt, wiederum 1 mg in die Schwanzvene eingespritzt. Nach Ablauf von 5 Minuten wird das Tier durch Öffnen der Halsgefäße entblutet (Blutprobe Nr. 17). Bei der Sektion des Tieres ist eine leichte Entzündung des Duodenums und des anschließenden Dünndarmabschnittes festzustellen. Sonst keine Veränderung.

Das Blut einer weiteren Ratte wird mit 10 ccm 0,9proz. Kochsalzlösung und 1 mg Thyroxin versetzt, das in 1 ccm der Kochsalzlösung unter Zusatz von etwas NaOH gelöst ist. Die Blutmischung bleibt bei 19°C unter mehrmaligem Umrühren mit einem Glasstab für 2 Stunden stehen (Blutprobe Nr. 18).

B. Ausführung des Versuchs:

Versuchstiere: Rana temporaria-Larven der gleichen Herkunft wie in Versuch 611.

Beginn des Versuchs: 28. Mai 1923.

Durchschnittsgröße: Gesamtlänge: 22 mm; Rumpflänge: 7,5 mm; Rumpfbreite: 5,0 mm.

Entwicklungsstadium: Extremitätenanlagen eben als kleine weißliche Verdickungen erkennbar.

Anzahl der Tiere: vier Gruppen zu je zehn Larven. Wassermenge: bei Einwirkung der Lösungen je 200 ccm, später je 800 ccm.

Versuchsanordnung:

Gruppe a: Kontrolle.
,, b: Blutprobe Nr. 17 (5 Minuten nach der dritten Thyroxininjektion).
,, c: Blutprobe Nr. 18 (1 mg Thyroxin + Blut + 0,9proz. NaCl-Lösung. 2 Stunden).
,, d: 1 mg Thyroxin in Lösung.

Verlauf des Versuchs:

29. Mai. 9 Uhr vormittags. In Gruppe c sind drei Tiere tot, die übrigen sind sehr schwächlich. Der Leib der Tiere ist stark eingezogen, der Rücken kyptotisch gebogen, der Ruderschwanz gekrümmt und verschmälert, bei den toten Tieren an der Spitze aufgerollt (vgl. Abb. 7). Eine Einschmelzung von Larvalorganen wie sie für Schilddrüsenwirkung charakteristisch ist, liegt nicht vor. Die Tiere verhalten sich wie bei Vergiftung. Um 10 Uhr morgens kommen in die Schale der Gruppe c, deren Inhalt noch ganz klar ist, zehn neue Larven der gleichen Herkunft: Gruppe c. In den übrigen Gruppen ist nichts Wesentliches festzustellen. Um 7 Uhr nachmittags werden sämtliche Gruppen in frisches Wasser übertragen. In Gruppe c_1 sind wiederum fünf Tiere tot. Die fünf übrigen zeigen ähnliche Veränderungen wie die Tiere der Gruppe c. Die Blutflüssigkeit ist in Gruppe c bzw. c_1 viel dunkler gefärbt als in Gruppe b. 30. Mai. In Gruppe c sind weitere drei Tiere tot. 31. Mai. Die Larven der Gruppe d lassen eine deutliche Verschmälerung des Rumpfes erkennen. Auch in Gruppe b sind die Kaulquappen etwas schmäler als in der Kontrollgruppe.



Abb. 7.

2. Juni. Extreme Thyroxinwirkung in Gruppe d.

3. Juni. In der letztgenannten Gruppe sind sämtliche Tiere tot. Maximale Reduktion usw. (s. Abb. 8c). Die Froschlarven der Gruppe b (s. Abb. 8b) zeigen im Vergleich zu den Kontrolltieren (s. Abb. 8a) noch deutliche Verschmälerung und Einziehung des Rumpfes; die hinteren Extremitätenanlagen sind um durchschnittlich 1 mm größer als in Gruppe a, in der sie die Form kleiner halbkugeliger Knospen aufweisen, während sie in Gruppe b kurze Stummelform besitzen. Dagegen ist an den Larvalorganen zwischen beiden Gruppen kein Unterschied festzustellen. Die von Gruppe c_1 noch überlebenden Tiere zeigen weder Schwanzeinschmelzung noch Wachstumshemmung. Die Hornzähnchen und Hornhäkchen sind etwas defekt.

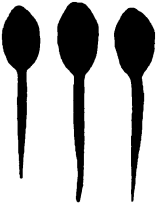


Abb. 8a.

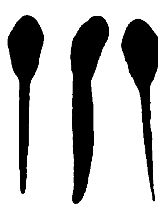


Abb. 8b.

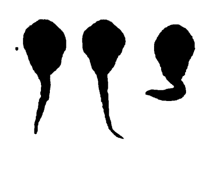


Abb. 8c.

25. Juni. Die Larven der Gruppe c_1 leben noch immer; Ruderschwanz gut erhalten, Extremitätenentwicklung nicht beschleunigt. Gruppe a und b stimmen hinsichtlich Wachstum wie Entwicklung vollkommen überein. Die Verschmälerung des Rumpfes hat sich wieder gänzlich ausgeglichen. Der Versuch wird abgebrochen.

Ergebnis des Versuchs 618.

Eine Ratte, die in mehreren Zwischenräumen schon zweimal 1 mg Thyroxin injiziert erhielt, wird 5 Minuten nach der dritten intravenösen Einspritzung entblutet. Das auf diese Weise gewonnene Blut ruft im Kaulquappenversuche keine dauernden Folgeerscheinungen hervor. Jedoch ist im Gegensatz zu vorausgehenden Versuchen, in welchen das nach der ersten oder zweiten Injektion gewonnene Blut ohne jeden charakteristischen Einfluß war, für kürzere Zeit eine Verschmälerung des Rumpfes und eine mäßige vorübergehende Förderung der Extremitätenentwicklung zu beobachten. Rattenblut, das nach Verdünnung mit physiologischer NaCl-Lösung und Zusatz von 1 mg Thyroxin 2 Stunden unter mehrmaligem Rühren stehen bleibt, wirkt auf Kaulquappen stark toxisch. Bei den überlebenden Tieren ist der Schilddrüseneffekt abgeschwächt.

Versuch 620.

A. Gewinnung des Versuchsmaterials:

Einer 125 g schweren Ratte, die schon am 19. (intravenös) und 26. (subkutan) Mai je 1 mg Thyroxin eingespritzt erhielt, wird am 2. Juni wiederum 1 mg Thyroxin in die Schwanzvene eingespritzt. Nach 5 Minuten wird das Tier durch Öffnen der Halsvenen entblutet (Blutprobe Nr. 19).

Dem Blute einer anderen Ratte werden 20 ccm einer 0,9proz. NaCl-Lösung zugesetzt. Nach kräftigem Durchschütteln wird zentrifugiert. Der auf diese Weise gewonnenen, klaren, schwach gelblich gefärbten Flüssigkeit wird 1 mg Thyroxin (gelöst in schwach alkalischer 0,9proz. NaCl-Lösung) zugefügt. Hierauf bleibt sie unter mehrmaligem Schütteln 2 Stunden lang bei 19°C stehen (Blutprobe Nr. 20).

Das Sediment wird noch dreimal mit je 15 ccm 0,9proz. NaCl-Lösung auf der Zentrifuge gewaschen. Zuletzt wird es in 20 ccm 0,9proz. NaCl-Lösung aufgeschüttelt, wobei 1 mg Thyroxin (in 1 ccm schwach alkalischer 0,9proz. NaCl-Lösung gelöst) zugesetzt wird. Die Mischung bleibt dann unter mehrmaligem Schütteln für 2 Stunden bei 19°C stehen (Blutprobe Nr. 21).

B. Ausführung des Versuchs:

Versuchstiere: Rana temporaria-Larven wie in Versuch 611.

Beginn des Versuchs: 2. Juni 1923 7 Uhr nachmittags.

Durchschnittsgröße der Tiere: Gesamtlänge: 27 mm; Rumpflänge: 9,0 mm; Rumpfbreite: 5,3 mm.

Entwicklungsstadium: Extremitätenanlagen als kleine halbkugelige Knöpfe sichtbar.

Anzahl der Tiere: 5 Gruppen zu je 10 Larven.

Wassermenge: bei Einwirkung der Lösungen je 200 ccm; später je 800 ccm.

Versuchsanordnung:

Gruppe a: Kontrolle.
,, b: Blutprobe Nr. 19 (5 Minuten nach der dritten Thyroxin-einwirkung).
,, c: Blutprobe Nr. 20 (Serum + Thyroxin).
,, d: ,, Nr. 21 (Blutkörperchen + Thyroxin).
,, e: 1 mg Thyroxin in Lösung.

Verlauf des Versuchs:

3. Juni. 9 Uhr morgens. In Gruppe d sind vier Kaulquappen tot. – 7 Uhr nachmittags. Sämtliche Kaulquappen werden in frisches Wasser übertragen. In Gruppe a leben alle Tiere, ebenso in Gruppe c und e. In Gruppe b sind sechs Larven bewegungslos, das Herz derselben pulsiert aber noch. In Gruppe d ist nunmehr auch der Rest der Tiere gestorben.

4. Juni. In Gruppe b sind fünf, in Gruppe c drei der Kaulquappen tot. In Gruppe a und e leben dagegen noch alle.

6. Juni. In Gruppe e und c beginnende Schwanzreduktion. Hornkiefer abgeworfen. Beschleunigung der Extremitätenentwicklung. Die Larven der Gruppe b sind, mit den Kontrolltieren verglichen, etwas kleiner und schmäler. In Gruppe c sind weitere Tiere tot, so daß nur noch vier leben.

8. Juni. Gruppe c und e: sehr starke typische Thyroxineinwirkung. In Gruppe b ist eine ganz leichte Förderung der Extremitätenentwicklung und ein geringes Zurückbleiben im Wachstum zu beobachten (durchschnittlich 2 mm).

9. Juni. Im Laufe des Tages sterben alle Tiere der Gruppe e unter den Zeichen extremer Schilddrüsenwirkung. Bei den Froschlarven der Gruppe c ist der Tod noch bis zum folgenden Tag verzögert.

7. Juli. Die geringen Unterschiede zwischen Gruppe a und b haben sich im Laufe der Zeit wieder ausgeglichen, so daß sie äußerlich, was Wachstum und Entwicklung betrifft, übereinstimmen. Der Versuch wird abgebrochen.

Ergebnis des Versuchs 620.

Einer Ratte werden in mehrtägigen Zwischenräumen dreimal 1 mg Thyroxin (gelöst) in die Schwanzvene eingespritzt. Das 5 Minuten nach der letzten Injektion entnommene Blut ruft im Kaulquappenversuche ganz leichte Entwicklungsbeschleunigung und Wachstumshemmung hervor. Ein Teil der Tiere stirbt unmittelbar nach der Einwirkung ab. Das nach Verdünnung mit etwas 0,9proz. NaCl-Lösung durch Zentrifugieren gewonnene Blutserum einer Ratte vermag die spezifische Wirkung von 1 mg Thyroxin nicht wesentlich abzuschwächen. Es wirkt aber viel weniger toxisch als eine mit 1 mg Thyroxin versetzte Aufschwemmung des abzentrifugierten Blutsedimentes, bei deren Zusatz sämtliche Tiere schon nach 24 Stunden absterben.

Versuch 625.

A. Gewinnung des Versuchsmaterials:

Am 29. Mai 1923 wird eine 150 g schwere, 90 Tage alte Ratte durch Öffnen der Halsgefäße entblutet. Dem Blute wird 1 ccm einer 0,9proz. NaCl-Lösung zugesetzt. Die Blutflüssigkeit bleibt unter mehrmaligem

Umrühren für 1 Stunde in einem bedeckten Bechergläschen bei 2°C stehen (Blutprobe Nr. 22).

Dem in gleicher Weise gewonnenen Blut einer zweiten Ratte des gleichen Wurfes wird 0,1 mg Thyroxin (gelöst in 1 ccm einer 0,9proz. NaCl-Lösung unter OH-Zusatz) zugesetzt. Die Flüssigkeit bleibt für 1 Stunde wie oben stehen (Blutprobe Nr. 23).

Das Blut einer dritten Ratte des gleichen Wurfes wird nach der Entnahme mit 20 ccm einer 0,9proz. NaCl-Lösung versetzt, mit einem Glasstab sorgfältig verrührt und zentrifugiert. Das klare Zentrifugat wird abgegossen und mit 0,1 ccm Thyroxin (wie oben) versetzt. Hierauf bleibt die Serumflüssigkeit für 1 Stunde stehen (Blutprobe Nr. 24).

Das Sediment wird fünfmal mit je 20 ccm 0,9proz. NaCl-Lösung auf der Zentrifuge ausgewaschen, schließlich in weiteren 20 ccm aufgeschüttelt und mit 0,1 mg Thyroxin versetzt. Sodann wird die Flüssigkeit ebenfalls für 1 Stunde zur Seite gestellt (Blutprobe Nr. 25).

B. Ausführung des Versuchs:

Versuchstiere: Rana temporaria-Larven der gleichen Herkunft wie in Versuch 611.

Beginn des Versuches: 30. Mai 1923. 3 Uhr nachmittags.

Durchschnittsgröße: Gesamtlänge: 24 mm; Rumpflänge: 8 mm; Rumpfbreite: 5,2 mm.

Entwicklungsstadium: Extremitätenanlagen als kleine, weißliche Knospen erkennbar.

Anzahl der Tiere: sieben Gruppen zu je zehn Larven. Wassermenge: bei Einwirkung der Lösungen je 200 ccm, später je 800 ccm.

Versuchsanordnung:

Gruppe a: Kontrolle.
,, b: Blutprobe Nr. 22 (Blut von normaler Ratte).
,, c: ,, Nr. 23 (Blut + 0,1 mg Thyroxin).
,, d: ,, Nr. 24 (Serum + 0,1 mg Thyroxin).
,, e: ,, Nr. 25 (Blutsediment + 0,1 mg Thyroxin).
,, f: Thyroxin 0,1 mg.
,, g: 20 ccm 0,9proz. NaCl-Lösung.

Verlauf des Versuchs:

31. Mai. 3 Uhr nachmittags. Wasserwechsel. In Gruppe d sind zwei Kaulquappen tot. 1. Juni. In Gruppe c und d sind je zwei Tiere gestorben. 2. Juni. Gruppe d: zwei Tiere tot.

3. Juni. Gruppe a, b und c stimmen hinsichtlich ihres Äußeren miteinander überein. Während in diesen drei Gruppen sämtliche Tiere am Leben sind, besteht die Gruppe d nur noch aus vier Larven, die durchgehends deutliche Thyroxinwirkung erkennen lassen. Die Tiere haben ihre Hornkiefer verloren, der Leib ist verschmälert, an den Schwanzspitzen beginnt die Einschmelzung des Gewebes. Jedoch ist die Thyroxinwirkung schwächer als in Gruppe f, in der die Reduktion der Larvalorgane noch weiter fortgeschritten ist. Viel schwächer als in Gruppe d kommt die Thyroxinwirkung in Gruppe e zum Ausdruck, in der die Kaulquappen zwar ihre Hornkiefer verloren haben, im übrigen aber bis jetzt nur schwache Schilddrüsensymptome

erkennen lassen. Insbesondere ist an den Ruderschwänzen noch keine Resorption festzustellen.

4. Juni. Die Larven der Gruppe c werfen im Laufe des Tages die Hornkiefer ab. Der Leib der Tiere hat sich verschmälert. An den Schwanzspitzen sind jedoch noch keine Resorptionsprozesse zu erkennen. Die Thyroxinwirkung in Gruppe d hat seit gestern keine weiteren Fortschritte gemacht. Die Kaulquappen der Gruppe e zeigen an den Ruderschwänzen auch heute noch keine Gewebseinschmelzung. In Gruppe f hat sich die Thyroxinwirkung dagegen extrem verstärkt; im Laufe des Tages sterben sämtliche Tiere der Gruppe ab.

5. Juni. Gruppen c und e stimmen hinsichtlich des Grades ihrer schwachen Thyroxinwirkung nun ziemlich überein. Weder in der einen noch in der anderen Gruppe ist eine nennenswerte Schwanzreduktion zu beobachten; auch in Gruppe d, die nach Ausscheiden der Gruppe e noch die stärkste Thyroxinwirkung zeigt, hat sie sich nicht mehr wesentlich verstärkt.

7. Juni. In Gruppe d langsames Fortschreiten der Gewebsreduktion.
9. Juni. In Gruppe d ein Tier tot.

10. Juni. Die Tiere der Thyroxingruppen c, d und e sind gegenüber Gruppe a, b und g im Wachstum zurückgeblieben, am stärksten in Gruppe d, in der auch die Einschmelzung des Ruderschwanzes am stärksten ist. Die Tiere dieser Gruppe sind durchschnittlich um 11 mm kleiner als die der Kontrollgruppen. Geringer ist die Größendifferenz in Gruppe e (durchschnittlich 8 mm) und Gruppe c (durchschnittlich 5 mm). Die Flossensäume sind in beiden Gruppen verschmälert. Die Entwicklung der Extremitäten ist in Gruppe c, d und e deutlich beschleunigt.

20. Juni. In Gruppe d sind zwei Tiere tot. Bei beiden ist je ein linkes Vorderbein durchgebrochen.

22. Juni. Gruppe d: letztes Tier der Gruppe tot. In Gruppe c und e kein weiteres Fortschreiten der Thyroxinwirkung. Die Tiere beider Gruppen sind im Wachstum zurückgeblieben, in e mehr als in c, und zeigen die für abgeschwächte Thyroxinwirkung charakteristische Vermengung larvaler und postlarvaler Merkmale (z. B. Verlust der Hornkiefer und Lippen einerseits, andererseits noch gut entwickelten Spiraldarm). Die Erscheinungen sind geringer in beiden Gruppen als in Gruppe e des Versuchs 611. — Der Versuch wird abgebrochen.

Ergebnisse des Versuchs 625.

Durch die Einwirkung des frisch entnommenen Blutes einer Ratte auf 0,1 mg Thyroxin (in 1 ccm 0,9proz. NaCl gelöst) in vitro wird dessen spezifische Wirkung sehr stark abgeschwächt. Geringer ist die Gegenwirkung einer entsprechenden Menge von Blutserum, das mit 0,9proz. NaCl-Lösung verdünnt wurde. Beinahe ebenso abschwächend wie das unverdünnte Blut wirkt dagegen das durch Zentrifugieren und Auswaschen mit 0,9proz. NaCl-Lösung gewonnene Blutsediment. Der Zusatz von normalem Rattenblut übt auf Kaulquappen keine toxische Wirkung aus. Ebenso fehlt diese dem mit 0,1 mg Thyroxin versetzten Blute, während ein Zusatz von 1 mg in vorausgehenden Versuchen vergiftend wirkte.

Besprechung der Ergebnisse.

Aus den vorliegenden Untersuchungen ergibt sich zunächst, daß das Thyroxin, wenn es nach Lösung in schwach alkalischer 0,9proz. NaCl-Lösung in die Blutbahn eingespritzt wird, schon wenige Minuten nach der ersten Injektion als solches nicht mehr nachweisbar ist. Noch viel deutlicher als die anfänglichen Versuche mit Kaninchen und Meerschweinchen zeigen das die Versuche mit Ratten, da bei diesen infolge ihrer geringeren Gesamtgröße der Einwand einer zu starken Verteilung des Thyroxins wegfällt.

Die in der Literatur über das Verhältnis von Blutmenge und Körpergewicht vorliegenden Angaben schwanken zwischen $^1/_{10}$ und $^1/_{19}$ des Körpergewichtes. Das Gewicht der in den Versuchen benutzten Ratten bewegte sich zwischen 120 bis 170 g, die durch Öffnen der Halsgefäße gewonnene Blutmenge, die natürlich nicht völlig der Gesamtblutmenge entspricht, betrug durchschnittlich 10 bis 14 ccm. Es müßten sich also noch zum mindesten zwei Drittel des eingespritzten Thyroxins in dem entnommenen Blute befinden. Da diese Menge dann zum Versuche mit 200 ccm Wasser verdünnt wurde, so wäre, falls sich das eingespritzte Thyroxin noch im Kreislauf befände, selbst im ungünstigsten Falle noch eine Konzentration von etwa 1 : 300000 anzunehmen, eine Verdünnung, bei der im Kaulquappenversuch mit Sicherheit ein positiver Schilddrüseneffekt zu erwarten ist, da nach meinen früheren Feststellungen bei ein- bis zweimaliger Einwirkung dazu schon Konzentrationen von 1 : 10000000 bis 20000000 genügen.

Die vorliegenden Versuchsprotokolle zeigen aber, daß durch das entnommene Blut weder Wachstum noch Entwicklung der Froschlarven beeinflußt wurde. Es ist deshalb anzunehmen, daß das Thyroxin schon sehr bald nach dem Eintritt in die Blutbahn in einer Weise verändert wird, daß es auf Kaulquappen spezifisch unwirksam wird. Das Thyroxin zeigt also in dieser Hinsicht Ähnlichkeit mit dem Adrenalin, das ebenfalls im Blute rasch zerstört wird.

Nun könnte allerdings das baldige Verschwinden des Thyroxins auch auf rascher Ausscheidung beruhen. Zur Stütze dieser Auffassungen könnten die Untersuchungen *Kendalls*[1]) herangezogen werden, der nach mehrmaliger Einspritzung von 200 mg in die Vena saphena eines Hundes während der folgenden 50 Stunden den Jodgehalt von Galle und Urin bestimmte und dabei feststellte, daß 43 Proz. der Jodmenge des injizierten Thyroxins in der Galle und 13 Proz. im Urin ausgeschieden wurden. Hinsichtlich des Restes vermutet *Kendall*, daß er durch die Thyreoidea des Tieres aus dem Blute aufgenommen und aufgestapelt wurde. In den vorliegenden Untersuchungen konnte aber weder durch

---

1) *E. C. Kendall*, The physiologic action of thyroxin. Endocrinology **8**, 156, 163.

die Einwirkung von Galle und Urin, noch durch Verfütterung der Leber der injizierten Tiere eine spezifische Wirkung erzielt werden. Daraus ist zu schließen, daß das Thyroxin nicht als solches, sondern nur in verändertem Zustande zur Ausscheidung kommt.

Die Verfütterung der Milz der Thyroxintiere hatte eine leichte Hemmung der Entwicklung und des Wachstums zur Folge; man könnte versucht sein, diese Erscheinung mit der von mir bei Einwirkung sehr stark verdünnter Thyroxinlösungen beobachteten Umkehr des Schilddrüseneffektes in Verbindung zu bringen. Indessen ist aus den Untersuchungen *Gudernatschs*[1]) bekannt, daß auch die Verfütterung von normaler Milz entwicklungshemmend wirken kann; ich selbst fand diese Beobachtung *Gudernatschs* in anderweitigen Versuchen bestätigt. Das Wachstum wurde dagegen bei diesen Fütterungsversuchen mit normaler Milz nicht gehemmt, sondern eher begünstigt. Es bedarf daher hinsichtlich dieser Wirkung der Milz von Thyroxintieren noch weiterer Untersuchungen; jedenfalls geht aber schon jetzt aus den Versuchen mit Sicherheit hervor, daß das Thyroxin nach intravenöser Einspritzung in der Milz nicht abgelagert wird, wenigstens nicht in unverändertem Zustande. Nach alledem ist anzunehmen, daß das Thyroxin als solches weder durch Phagocytose seitens des reticuloendothelialen Apparates noch durch Exkretionsvorgänge ausgeschieden wird. Die Versuche zeigen vielmehr, daß im strömenden Blute Stoffe vorhanden sind, die das Thyroxinmolekül in kürzester Zeit zu verändern und dadurch unwirksam zu machen vermögen. Damit erklärt sich ungezwungen die Feststellung *Kendalls*, daß selbst große Mengen von Thyroxin — *Kendall* injizierte einer Ziege in einem Falle 230 mg auf einmal — bei einmaliger Einführung ohne nennenswerten Effekt überwunden werden.

Viel langsamer als im strömenden Blute erfolgte diese Veränderung des Thyroxins innerhalb von Körperhöhlen; denn eine in die Pleurahöhle injizierte Thyroxinlösung erwies sich einige Stunden später noch als spezifisch wirksam. Doch war auch hier eine Abschwächung der Wirkung unverkennbar.

Entzieht sich das Thyroxin aber auch nach mehrmaliger intravenöser Einspritzung dem biologischen Nachweis? Diese Frage konnte infolge der beschränkten Thyroxinmenge, die mir zur Verfügung stand, noch nicht endgültig entschieden werden; immerhin wurden aber Anhaltspunkte dafür gewonnen, daß sich die Zerstörung des Thyroxins mit der zunehmenden Zahl der Injektionen verlangsamt. Das nach zweimaliger Einspritzung entnommene Blut zeigt noch keine wesentliche

---

[1]) *F. Gudernatsch*, Feedings experiments on Tadpoles. Amer. Journ. Anat. 15.

Wirkung; dagegen ist nach der dritten Injektion sowohl eine schwache Hemmung des Wachstums wie eine leichte Beschleunigung der Extremitätenentwicklung festzustellen. Die larvalen Organe werden jedoch nicht angegriffen. Auffallend ist, im Zusammenhang mit später zu besprechenden Befunden, eine während der ersten Tage eintretende Erhöhung der Mortalität, die nach ein- und zweimaliger Injektion fehlt. Es liegt natürlich nahe, zwischen dieser im Kaulquappenversuche erkennbaren verlangsamten Zerstörung des Thyroxins und den nach mehrmaliger Einspritzung von Thyroxin eintretenden Erscheinungen des Hyperthyreoidismus Beziehungen aufzustellen. Die Zahl meiner Versuche erlaubt mir jedoch noch nicht, zu dieser wichtigen Frage endgültig Stellung zu nehmen.

Nach den dargelegten Befunden war es natürlich von Interesse, zu untersuchen, ob das Thyroxin auch außerhalb des Körpers, in vitro, durch die Einwirkung von Blutflüssigkeit in seiner Wirksamkeit beeinflußt werden kann. Bei den diesbezüglichen Versuchen stellte sich heraus, daß die spezifische Wirkung des Thyroxins auf Froschlarven schon durch die 5 Minuten lange Einwirkung von frisch entnommenem Blute sehr beträchtlich abgeschwächt wird. Dauert die Einwirkung längere Zeit — 1 bis 2 Stunden —, so wirkt die Blutflüssigkeit überraschenderweise auf die Froschlarven stark toxisch ein: die Tiere sterben meist schon 12 bis 24 Stunden nach Versuchsbeginn ab, bevor noch irgendwelche typische Veränderungen zur Ausbildung gelangen können. Diese tödliche Wirkung kann sich nicht etwa durch den Eintritt unspezifischer Fäulnisvorgänge oder dergleichen erklären, da die Kaulquappen die Einwirkung der gleichen Menge normalen Blutes ohne weiteres überleben. Auffallenderweise besitzt das nach intravenöser Thyroxineinspritzung entnommene Blut diese toxische Wirkung nicht. Erst das Blut dreimal injizierter Tiere übt, worauf schon oben hingewiesen wurde, eine, wenn auch viel schwächere toxische Wirkung aus.

Welcher Natur die durch den Zusatz des Thyroxins in vitro entstehende toxische Substanz ist, liegt zurzeit noch im Dunkeln. Versuche, in welchen Serumflüssigkeit und Blutsediment nach Zufügen gleicher Mengen Thyroxins getrennt auf Kaulquappen zur Einwirkung kamen, ergaben, daß sie in beiden Fraktionen auftritt, im Sediment aber reichlicher als im Serum. Denn in ersterem Falle sterben die Tiere noch im Laufe der 24stündigen Einwirkung ab, bei letzterem erstreckt sich die tödliche Wirkung über mehrere Tage, und zudem nicht auf alle Tiere der Gruppe. Durch Kochen wird die toxische Wirkung anscheinend zerstört oder zum mindesten stark abgeschwächt. Jedenfalls ist das Thyroxin für die Entstehung der toxisehen Substanz von ausschlaggebender Bedeutung. Denn die Giftigkeit der Flüssigkeit steigt mit der Höhe des Thyroxinzusatzes. Sinkt derselbe auf 0,1 mg

(immer bezogen auf die Blutmenge einer Ratte), so überleben die Tiere die Einwirkung. Die giftig wirkende Substanz bildet sich anscheinend erst dann, wenn das Blut in *unverdünntem*, frischem Zustande *längere* Zeit auf die Thyroxinlösung einwirkt. Denn die Tiere blieben am Leben, wenn die Einwirkungsdauer zwischen Blut und Thyroxin *vor* dem Zusatz zum Zuchtwasser nur 5 Minuten betrug, obwohl die Menge des zugesetzten Thyroxins in beiden Fällen gleich groß war (nämlich 1 mg) und obwohl die nachfolgende Einwirkungsdauer auf die Kaulquappen übereinstimmend 24 Stunden währte.

Was die Abschwächung der spezifischen Thyroxinwirkung betrifft, so wurde festgestellt, daß sie am stärksten ist, wenn das Blut vor dem Zusatz zum Zuchtwasser in unverdünntem Zustande zur Einwirkung kommt. Die abschwächende Wirkung einer bestimmten Blutmenge ist um so geringer, je größer die Menge des zugesetzten Thyroxins ist. So ist der Erfolg, den das Blut *einer* Ratte auszuüben vermag, bei der Einwirkung auf 1 mg Thyroxin erheblich schwächer als bei Einwirkung auf 0,1 mg.

Stärkere Verdünnung des Blutes mit 0,9proz. NaCl-Lösung scheint dessen Wirkung auf das Thyroxin zu vermindern. In gleicher Weise ist auch der Einfluß des mit 0,9proz. NaCl-Lösung verdünnten Serums geringer als der des unverdünnten Blutes.

In einigen Versuchen konnte ferner gezeigt werden, daß auch das durch Zentrifugieren gewonnene und mit 0,9proz. NaCl-Lösung ausgewaschene Blutsediment den Einfluß des Thyroxins auf Froschlarven herabzudrücken vermag, und zwar stärker als das mit NaCl-Lösung verdünnte Blutserum.

Somit ergibt sich, daß sowohl das unverdünnte Blut, wie auch das Blutsediment auch in vitro die spezifische Wirkung des Thyroxins abschwächen. Es ist jedoch überaus wahrscheinlich, daß hierbei nicht der gleiche Ursachenkomplex zugrunde liegt. So spricht manches dafür, daß die Wirkung des Blutsedimentes auf Absorption beruht, insofern die mit NaCl-Lösung gewaschenen Blutkörperchen ähnlich wie Kohle, Kaolin oder dergleichen das in Lösung befindliche Thyroxin beim Schütteln mehr oder weniger vollständig absorbieren, so daß nur der allenfalls in Lösung gebliebene Rest und das durch Fressen von Blutkörperchen aufgenommene Thyroxin zur Wirkung kommt.

Dagegen dürfte der bei Einwirkung von frischem, unverdünntem Blute oder von Serum wie auch der im Kreislauf selbst eintretende Vorgang vorwiegend chemischer Natur sein: das Thyroxin wird dabei durch den Einfluß bestimmter Substanzen unwirksam gemacht. In welcher Weise dies erfolgt, soll Gegenstand weiterer Untersuchungen sein. Möglicherweise kommt dabei den Ca-Ionen des Blutes eine ge-

wisse Bedeutung zu, worauf das von *Leicher*[1]) festgestellte Verhalten des Calciumgehaltes des menschlichen Blutserums bei Thyreoidinbehandlung, bei Basedow und Myxödem hindeutet.

Es liegt nahe, aus den vorliegenden Untersuchungen auch einige Folgerungen für die Physiologie und Pathologie der Tätigkeit der Schilddrüse wie auch anderer inkretorischer Organe zu ziehen. Denn sie lassen erkennen, daß die Einstellung der Inkretmengen auf den für den Organismus günstigen Umfang nicht einzig und allein durch eine Beeinflussung der Drüsenzellen im Sinne einer erhöhten oder verminderten Sekretabgabe zu erfolgen braucht. Mindestens ebenso bedeutsam ist ein im Blute vorhandener Regulationsmechanismus, durch den die in das Blut abgegebenen Inkrete der einzelnen Drüsen auf das für den harmonischen Ablauf der Funktionen günstige Optimum abgestimmt werden, ein Vorgang, der sowohl durch Bindung wie Zerstörung des Inkretes erfolgen kann.

Die Anwesenheit einer inkretorischen Drüse im Organismus garantiert demnach noch nicht deren volle Wirkung, da das von ihr sezernierte Inkret durch den im Blute vorhandenen Regulationsmechanismus zerstört werden kann, bevor es noch charakteristische Wirkungen hervorzurufen vermochte. Damit sie diese durch ihr Inkret voll entfalten kann, ist es vielmehr unter anderem nötig, daß die Blutflüssigkeit auf dasselbe entsprechend eingestellt ist. Von diesem Gesichtspunkte aus lassen sich viele Erscheinungen auf dem Gebiete der inneren Sekretion, deren Deutung zurzeit Schwierigkeiten bereitet — ich erinnere insbesondere an Fragestellungen, die mit der periodischen Wirkung der Geschlechtsdrüsen zusammenhängen —, dem Verständnis näher bringen.

Daraus ergibt sich aber weiterhin, daß Disharmonien im inkretorischen System nicht immer auf einer primären Erkrankung des Entstehungsortes eines Inkretes, auf einer zu reichlichen oder zu geringen Inkretabgabe in den Kreislauf zu beruhen brauchen, sondern in gleicher Weise auch durch ein Versagen des Regulationsmechanismus bedingt sein können, sei es, daß das betreffende Inkret im Blute zu rasch oder zu langsam inaktiviert wird. Bei längerer Dauer dieser Schädigung werden dadurch wohl auch sekundäre Veränderungen in der Drüse selbst veranlaßt werden. Eine weitere Frage, die durch die in den vorliegenden Versuchen beobachtete Entstehung toxischer Substanzen angeregt wird, ist die, wieweit eine solche auch im kreisenden Blute bei Erkrankungen eintreten kann. Es ist beabsichtigt, in weiteren Versuchen zur Klärung dieser Probleme beizutragen.

---

[1]) *H. Leicher*, Deutsch. Arch. f. klin. Med. **141**, 85—116, 1922.

Zusammenfassung.

1. Das einem Tiere wenige Minuten nach einer einmaligen intravenösen Einspritzung einer Thyroxinlösung entnommene Blut ruft im Kaulquappenversuch keinen Schilddrüseneffekt hervor. In gleicher Weise ist auch die Einwirkung von Leber, Galle oder Harn dieser Tiere ohne spezifische Wirkung. Das Ergebnis wird in der Weise gedeutet, daß das Thyroxin nach einmaliger Einspritzung durch einen im strömenden Blute vorhandenen Regulationsmechanismus sehr rasch verändert und unwirksam gemacht wird.

2. Durch mehrstündiges Verweilen in einer Körperhöhle wird die charakteristische Wirkung der Thyroxinlösung gleichfalls deutlich vermindert; die Abschwächung ist jedoch geringer als bei Injektion in die Blutbahn.

3. Im Blute von Tieren, bei welchen die intravenöse Injektion von Thyroxin in mehrtägigen Zwischenräumen öfters wiederholt wird, scheint die Zerstörung des Thyroxins allmählich langsamer und unvollständiger vor sich zu gehen.

4. Eine sehr deutliche Abschwächung der spezifischen Wirkung einer Thyroxinlösung läßt sich auch außerhalb des Organismus, in vitro, durch kurzdauernde Einwirkung frisch entnommenen Blutes erzielen. Der Erfolg ist am stärksten bei Verwendung unverdünnten Blutes. Er ist um so geringer, je größer die Menge des zugesetzten Thyroxins ist.

5. Dauert die Einwirkung des Blutes auf die Thyroxinlösung in vitro 1 bis 2 Stunden, so wirkt der Zusatz dieses Blut-Thyroxingemisches zum Zuchtwasser auf Kaulquappen stark toxisch.

6. In geringerem Maße als durch unverdünntes Blut wird die spezifische Wirkung des Thyroxins durch die Einwirkung von verdünntem Blutserum abgeschwächt. Stärker wirkt das Schütteln mit ausgewaschenen roten Blutkörperchen; im letzteren Falle dürfte es sich um einen Resorptionsgang handeln.

7. Die Ergebnisse der Versuche lassen auf einen im Blute vorhandenen Regulationsmechanismus schließen, durch den die in das Blut abgegebenen Inkretmengen der einzelnen Drüsen auf das für den harmonischen Ablauf der Funktionen günstige Optimum abgestimmt werden.

Über das Flockungsoptimum der durch Essigsäure fällbaren Substanz des Tuberkulins.

Von

Erich Gabbe.

(Aus der medizinischen Klinik Lindenburg der Universität Köln.)

(Eingegangen am 30. Juli 1923.)

Bei dem Versuche, die wirksame Substanz des Tuberkulins zu isolieren, fällte *Robert Koch* (1) aus dem Tuberkulin durch 60proz. Alkohol eine Substanz aus, die auf Grund ihrer Eigenschaften als Eiweißkörper angesprochen wurde. In der als „gereinigtes Tuberkulin" bezeichneten wässerigen Lösung dieses Körpers rief Essigsäure eine starke Trübung bis zu geringem Niederschlage hervor, der aber bei weiterem Zusatz von Essigsäure wieder verschwand. Im folgenden soll über physikalisch-chemische Untersuchungen dieser durch Essigsäure fällbaren Substanz des Alttuberkulins berichtet werden; dieselben wurden angeregt durch ähnliche Versuche, die mit dem ebenfalls durch Essigsäure fällbaren Tuberkuloprotein von *Toenniessen* (2) von uns angestellt wurden [vgl. *Gabbe* (3)].

1. Flockungsoptimum und isoelektrischer Punkt des Stoffes.

Es wurde so vorgegangen, wie *Michaelis* und *Rona* (4) zur Bestimmung des Flockungsoptimums des denaturierten Serumalbumins verfuhren. Das Tuberkulin wurde mit der zwei- bis vierfachen Menge Wasser und diese Lösung noch zehnfach mit einem Acetatpuffergemisch verdünnt, welches so viel Natriumacetat enthielt, daß dessen Konzentration nach der Verdünnung m/100 war. Die Menge der Essigsäure wurde von einem Röhrchen zum anderen auf das Doppelte erhöht. Die Wasserstoffzahlen (p_H) der einzelnen Röhrchen umspannten einen Bereich von p_H 5,3 bis p_H 2,8. Um Tuberkulin zu sparen, wurden die Röhrchen in der Gesamtmenge von 1 ccm angesetzt. Die Wasserstoffzahlen wurden in der üblichen Weise berechnet und an zwei bis drei Proben jeden Versuchs stets elektrometrisch gemessen; hierzu wurde die betreffende Probe in der zur Messung benötigten größeren Gesamtmenge angesetzt. Zur Verwendung kam das „Alt-Tuberkulin" (Höchster Farbwerke) und das „diagnostische Tuberkulin nach Moro" (E. Merck-Darmstadt). Über die Resultate berichtet Tabelle I.

Tabelle I.
Flockung von Tuberkulin bei verschiedener Wasserstoffzahl.

Nr.	Röhrchen Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Ablesung nach Stunden
	Essigsäure : Natriumacetat	0,2	0,41	0,82	1,64	3,28	6,5	13,0	26,0	52,0	104,0	
	p_H	5,28[1]	5,1	4,8	4,5	4,2	3,89[1]	3,6	3,3	3,10[1]	2,8	
1	Alt-Tuberkulin 1:30 . . .	0	0	±	+	+++	++	(+)	±	±	0	1/4
		0	0	×	×××	××××	×××	××	×	±	±	10
2	Alt-Tuberkulin 1:50 . . .	0	0	±	+	++	+	(+)	±	±	0	1/4
		0	0	+	+++	×××	××	×	+	±	0	10
3	Diagnostisches Tuberkulin *Moro* 1:50 . . .	0	0	0	++	+++	+++	++	++	+ (+)	+	10
4	dreimal gefällte Substanz 20 mg-Proz.	0	0	+	××	××××	××××	×××	××	+	±	10
5	dreimal gefällte Substanz 10 „	0	0	+	++	×××	××	×	++	±	0	10

0: Lösung klar; + bis +++: schwache bis starke Trübung. × bis ××××: schwache bis vollständige Flockung.
[1]) Elektrometrisch gemessen.

Die Versuche 1, 2 und 3 zeigen, daß die beiden Tuberkulinsorten im Bereiche von p_H 4,2 bis p_H 3,9 eine Trübung darbieten, welche nach kurzer Zeit zur Flockung führt, dieselbe nimmt bei Verminderung oder Erhöhung des p_H in gleicher Weise allmählich ab bis zum völligen Verschwinden.

Versuch 4 und 5 wurden mit der auf folgende Weise isolierten Substanz dargestellt: 10,0 ccm Tuberkulin wurden mit 490 ccm Acetatgemisch von p_H 4,1 (Gehalt an Natriumacetat m/100) verdünnt, der sich bildende Niederschlag wurde nach zehnstündigem Stehen abzentrifugiert, die Flüssigkeit abgegossen, der Bodensatz einmal mit obigem Acetatgemisch gewaschen, wieder zentrifugiert, sodann der Bodensatz nach Abgießen der Flüssigkeit unter Zufügen von einigen Tropfen n/10 NaOH in Wasser gelöst und die Lösung mit n/10 HCl gegen Lackmus neutralisiert. Die Säurefällung wurde alsdann in derselben Weise noch zweimal wiederholt, der Rückstand wieder gelöst und die Lösung auf 10,0 ccm aufgefüllt. Die Flüssigkeit war dann nur noch ganz schwach gelblich gefärbt. Mit der vierfachen Verdünnung dieser Lösung wurde der Eiweißgehalt nach der von *Mestrezat* (5) für den Liquor cerebrospinalis angegebenen „diaphanometrischen“ Methode — diese hat sich uns an gewichtsanalytisch kontrollierten Eiweißlösungen und am Liquor cerebrospin. gut bewährt — bestimmt. Die zu den Versuchen angegebenen Mengen der Substanz beziehen sich auf die so gewonnenen Werte.

Nach Versuch 4 und 5 stimmt das Flockungsoptimum der auf obige Weise gereinigten Substanz mit dem des unveränderten Tuberkulins gut überein. *Michaelis* und *Rona* (4) sowie *Michaelis* und *Pechstein* (6) haben für mehrere Eiweißkörper den Nachweis geliefert, daß das Säurefällungsoptimum zusammenfällt mit dem isoelektrischen Punkte der Substanz. Die weiteren Versuche waren daher darauf gerichtet, zu ermitteln, ob das gleiche für die hier untersuchte Substanz zutrifft.

Zu diesem Zwecke wurden Tuberkulinverdünnungen mit Acetatgemischen wie in den ersten Versuchen angesetzt, jedoch in kleinerem Bereiche der p_H, der Lage des Flockungsmaximums entsprechend und mit feinerer Abstufung der Wasserstoffzahlen; die Menge der Essigsäure bildete in den einzelnen Proben eine Reihe mit dem Quotienten 1,25. Die Wanderungsrichtung im Potentialgefälle wurde in dem von *Michaelis* (7) angegebenen Apparat für mikroskopische Kataphorese festgestellt unter genauer Beachtung der durch die Elektroendosmose hervorgerufenen Flüssigkeitsströmungen.

In den Versuchen 6 und 7 (vgl. Tabelle II) wurde der isoelektrische Punkt der mikroskopisch sichtbaren Flöckchen bei p_H 4,10 gefunden mit der Maßgabe, daß die Teilchen bei p_H 4,19 negativ und bei p_H 4,00 positiv geladen waren. Der isoelektrische Punkt fällt demnach mit dem Flockungsoptimum zusammen. Mit der Feststellung des isoelektrischen Punktes ist das Verhältnis der mittleren Säurestärke (k_a) zur mittleren Basenstärke (k_b) der Substanz gegeben; diese für jede Eiweißart charakteristische Konstante kann nach der Formel $J = \sqrt{\frac{k_a}{k_b}}\, k_w$ berechnet werden [*Michaelis* und *Rona* (4)]; in dieser bedeutet J die p_H des isoelektrischen Punktes, k_w die Dissoziationskonstante des Wassers. Hiernach ergibt die Berechnung der Säurebasendissoziationskonstante der hier untersuchten Substanz den Wert 6,3 . 10^5.

Tabelle II.

Kataphoretische Versuche zur Bestimmung des isoelektrischen Punktes.

Nr.	Röhrchen Nr. Essigsäure : Natriumacetat p_H (elektrometrisch)	1 2,62 4,29	2 3,28 4,19	3 4,10 4,10	4 5,12 4,00	5 6,40 3,87
6	Alt-Tuberkulin 1:50	—	—	—	+	+
		—	—	schw. +	+	+
		—	—	±	+	+
7	säurefällbare Substanz 20 mg-Proz.	—	—	—	+	+
		—	—	schw. +	+	+
		—	—	schw. —	+	+

— anodische, + kathodische Wanderungsrichtung.

Hier sei einiges über Vorkommen und Eigenschaften der Substanz angefügt. In Tuberkulinproben mit verschiedenen Herstellungsnummern schwankte der auf die oben angegebene Weise ermittelte Gehalt an säurefällbarer Substanz zwischen 1,2 und 3,1 Prom. In einem Falle wurde der Gehalt von 10,0 ccm Tuberkulin zu 1,8 Prom. gewichtsanalytisch ermittelt.

Die Mehrzahl der Eiweißreaktionen fiel mit der Substanz positiv aus, wie folgende Übersicht zeigt:

Kochprobe	+
*Heller*sche Ringprobe	+
Ferrocyankali-Essigsäure.	+
Trichloressigsäure	+
Biuretreaktion	+
Xantoproteinreaktion	+
*Millon*sche Reaktion	−
Adamkiewiczs Reaktion	+
*Liebermann*sche Reaktion	+
Neubauer und *Rohdes* Reaktion .	+
Arnolds Reaktion.	−

Wir sind daher wohl berechtigt, die Substanz den Eiweißkörpern zuzurechnen. Die spezifische Wirksamkeit des Stoffes haben wir in der Weise geprüft, daß wir Kranken mit Lungentuberkulose die Substanz in hoher Verdünnung, und zwar je 0,1 ccm intrakutan injizierten zugleich mit entsprechenden Tuberkulinverdünnungen; dabei ergab sich, daß eine Lösung des isolierten Tuberkulineiweißes 1 : 10 Millionen etwa ebenso stark wirkte wie eine Tuberkulinverdünnung 1 : 10000.

Es möge hier noch ein Versuch angefügt werden, der zeigt, daß Fällungsoptimum und isoelektrischer Punkt des säurefällbaren Tuberkulineiweißes in ihrer Lage mit denselben Punkten des von *Toenniessen* (2) aus Tuberkelbazillen dargestellten Tuberkuloproteins übereinstimmen.

Tabelle III.

Versuch 8. Flockungsoptimum und isoelektrischer Punkt von Tuberkuloprotein — *Toenniessen.*

Röhrchen Nr. Essigsäure : Na-Acetat p_H	1 0,2 5,3	2 0,41 5,1	3 0,82 4,8	4 1,64 4,5	5 3,28 4,2	6 6,5 3,9	7 13,0 3,6	8 26,0 3,3	9 52,0 3,1	10 104,0 2,8	Ablesung nach Stunden
Tuberkuloprotein (*Toenniessen*)	0	0	±	+	++	++	+ (+)	+	±	0	½
20 mg-Proz. . . .	0	0	+	++	+++	××	+++	++	+	0	10
Kataphorese . . .					—	± —	+				

Bedeutung der Zeichen wie in Tabelle I und II.

Da die hier festgelegten Eigenschaften scharf bestimmbar sind, und wir andererseits Eiweißkörper, die den isoelektrischen Punkt bei derselben p_H aufweisen, nicht kennen, so liegt die Vermutung nahe,

daß die beiden Körper identisch sind; es würde dies allerdings nicht in Einklang stehen mit der Ansicht *Toenniessens*, daß der von ihm aus den Bazillen direkt isolierte Eiweißkörper im Alttuberkulin nicht enthalten sei; indes gelangte auch *Blum* (8) auf Grund von klinischen Beobachtungen über das Wiederaufflammen früherer Reaktionsstellen von Alttuberkulininjektionen nach Injektionen von Tuberkuloprotein zu der Annahme, daß letzteres im Tuberkulin enthalten sei. Allerdings ist dieser Schluß nicht zwingend, wenn die Ansicht *Ruppels* (9) zu Recht besteht, nach der ein und derselbe Tuberkulingiftkern chemisch verschiedenen Substanzen des Tuberkelbazillus gemeinsam sein soll. Gegen die Annahme einer Identität von säurefällbarer Substanz des Tuberkulins mit Tuberkuloprotein kann aber, wie unsere Versuche zeigen, auch nicht der Befund von *Löwenstein* und *Pick* (10) angeführt werden, daß im Alttuberkulin eine spezifisch wirksame und zugleich biuretnegative Substanz enthalten ist. Dieser Nachweis deutet ja nur darauf hin, daß neben dem säurefällbaren Eiweiß auch noch andere spezifisch wirksame Stoffe im Alttuberkulin enthalten sind.

Über Versuche, welche den Einfluß von Salzen auf die Flockung zum Gegenstand hatten, sei hier nur kurz berichtet; sie zeigten, daß die Salze in ähnlicher Weise auf die Flockung des Tuberkulineiweißes von Einfluß sind, wie das von anderen Eiweißkörpern bereits bekannt ist. Es fand sich sowohl eine Verminderung der Flockungsintensität, besonders bei den Salzen mit einwertigen Ionen, wie auch eine Verschiebung der Flockung nach der weniger sauren oder stärker sauren Seite, besonders durch mehrwertige Ionen, die als Folge der verschiedenen Adsorbierbarkeit der betreffenden Ionen aufgefaßt werden kann. Eine ähnliche Wirkung der Salze wurde von *Michaelis* und *v. Szent-Györgyi* (11) bei der Ausflockung des Caseins gefunden.

2. Der Einfluß von Lecithin auf die Flockung.

Es war noch von Interesse, den Einfluß von Lecithin auf die Flockung des Tuberkulineiweißes kennenzulernen, und zwar im Hinblick auf die Möglichkeit einer Verwertung unserer Befunde bei der Serodiagnostik der Tuberkulose.

In neuerer Zeit sind von verschiedenen Seiten gerade die mehr oder weniger rein dargestellten Eiweißkörper der Tuberkelbazillen zu Komplementbindungsversuchen oder die entfetteten Bazillen zu Agglutinationsversuchen empfohlen worden [*Wassermann* (13), *Fornet* (12)], so daß die Verwendung eines Stoffes mit so gut definierbaren physikalischen Eigenschaften, wie sie der hier untersuchte Körper aufweist, bei serodiagnostischen Untersuchungen an Tuberkulösen naheliegt. *Wassermann* (13) hat jüngst darauf hingewiesen, daß die Komplementbindungsmethode bei Verwendung eines durch Entfetten von Tuberkelbazillen mit Tetralin hergestellten Antigens dann wesentlich bessere Resultate liefert, vor allem auch in klinischer Hinsicht, wenn dem zu untersuchenden Serum Lecithin zugesetzt wird.

Die Versuche 9 bis 15 (Tabelle IV) zeigen deutlich, daß das Lecithin (*E. Merck*) die Säurefällung des Tuberkulineiweißes verstärkt; bei Verwendung einer Eiweißkonzentration, die an sich schon geringe Flockung im optimalen Bereich der p_H bedingt, ist die Flockung nach Lecithinzusatz wesentlich stärker (Versuch 9 und 10); wird das Eiweiß in so geringer Konzentration verwandt, daß bei p_H 4,1 eine Trübung der Flüssigkeit noch nicht zu erkennen ist, so kommt es nach Zusatz von Lecithin zu ausgesprochener Flockung (Versuch 13); diese tritt nicht auf, wenn das Lecithin allein bei den gleichen Wasserstoffzahlen untersucht wird; nur die Röhrchen mit den höchsten angewandten Wasserstoffzahlen lassen auch eine Trübung erkennen, die auf das Lecithin allein zu beziehen ist (Versuch 11); die p_H dieser Röhrchen nähert sich stark dem Fällungsoptimum des Lecithins, das bei unserem Präparat in naher Übereinstimmung mit *Feinschmidt* (14) bei p_H 2,8 gefunden wurde.

Außer dieser Verstärkung der Flockung des Tuberkulineiweißes durch Lecithin tritt in den Versuchen aber noch eine Verschiebung des Optimums nach der sauren Seite zutage. Das gleiche wird auch durch die folgenden Versuche für den isoelektrischen Punkt bewiesen.

Es liegt wohl nahe, diese Befunde so zu deuten, daß das ausfallende Eiweiß das Lecithin, mit dem es vielleicht schon in der Lösung Adsorptionsverbindungen eingeht, aus der Lösung mitreißt; dabei werden die Fällungseigenschaften des Eiweißes durch die des Lecithins modifiziert. Das Resultat der Wechselwirkung zwischen dem Eiweiß und Lecithin ist hier ein ganz anderes wie in den Versuchen von *Fein-*

Tabelle IV.

Einfluß von Lecithin auf die Flockung von Tuberkulineiweiß.

Nr.	Tuberkulineiweiß in mg-Proz.	Lecithin in mg-Proz.	1 p_H 5,3	2 5,1[1]	3 4,8	4 4,5	5 4,2	6 3,9	7 3,6	8 3,3	9 3,1
9	18	0	0	±	+	++	××	××	×	++	+
10	18	10	0	±	++	+++	××××	××××	+++	++ (+)	++
11	0	20	0	0	0	0	0	0	0	±	++
12	1,8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
13	1,8	20	0	0	0	+	++	××	×××	×××	+++
14	3,6	0	0	0	±	+	+	+	(+)	±	0
15	3,6	20	0	0	±	++	××	×××	+++	+++	++

0: Lösung klar; + bis +++: schwache bis starke Trübung; × bis ××××: schwache bis vollständige Flockung.

[1]) Acetatpufferung mit n/100 Natriumacetatgehalt wie in den Versuchen 1 bis 5.

Ablesung in allen Versuchen nach 2 Stunden.

Tabelle V.

Verschiebung des isoelektrischen Punktes durch Lecithin.

Nr.	Röhrchen Nr. Essigsäure : Natriumacetat p_H (elektrometrisch)	1 15,6 3,72	2 19,5 3,59	3 24,4 3,49	4 30,5 3,40	5 38,1 3,29
	Tuberkulineiweiß 1,8 mg-Proz.	—	—	+	+	
	Lecithin . . . . 10 „	—	± (schw. +)	+	+	
	Tuberkulineiweiß 1,8 „	—	—	—	+	+
	Lecithin . . . . 20 „	—	—	schw. +	+	+

—: anodische; +: kathodische Wanderungsrichtung. Acetatpufferung mit n/100 Natriumacetatgehalt.

schmidt (14), in denen das Fällungsoptimum des Lecithins durch einen geringen Serumzusatz stark nach der weniger sauren Seite verschoben wurde; der Unterschied ist wohl durch die stark abweichenden Eigenschaften der betreffenden wirksamen Eiweißkörper bedingt. Da auf den Zustand des Lecithins der Salzgehalt der Lösung von großem Einfluß ist [*Porges* und *Neubauer* (15)], so muß sich dieser auch bei der Flockung von Tuberkulineiweiß + Lecithin geltend machen. Zunehmender NaCl-Gehalt verstärkt z. B. die Flockungstendenz des Lecithins, vermindert jedoch im Bereiche der physiologischen Salzkonzentration die Flockung des Eiweißes; sind Eiweiß und Lecithin zusammen in der Lösung, so ist das Ergebnis die Resultante dieser beiden gegensätzlichen Wirkungen; berücksichtigt man, daß das Ergebnis durch Variation der Mengen der einzelnen Kolloide weiter stark verändert werden muß, so geht aus diesen Überlegungen hervor, wie mannigfach die Einflüsse sind, die in derartigen Systemen zur Geltung kommen und die bei serologischen Versuchen in Rechnung zu stellen sind.

Zusammenfassung.

1. Die aus Tuberkulin durch Acetatgemische von p_H 4,8 bis 3,1 fällbare Substanz hat ein Säurefällungsoptimum und einen isoelektrischen Punkt bei der Wasserstoffzahl p_H 4,10. Mit der so darstellbaren Substanz fallen die meisten Eiweißreaktionen positiv aus.

2. Anorganische Salze vermindern entweder die Flockung dieser Substanz oder verschieben bei Vorhandensein stark adsorbierbarer Ionen das Flockungsoptimum.

3. Lecithin verstärkt die Flockung des säurefällbaren Tuberkulineiweißes und verschiebt den isoelektrischen Punkt desselben nach der sauren Seite.

Literatur.

1) *Robert Koch*, Deutsch. med. Wochenschr. 1891, Nr. 43, S. 1189. – 2) *Toenniessen E.*, Münch. med. Wochenschr. 1922, Nr. 26, S. 957. – 3) *E. Gabbe*, ebendaselbst 1923, Nr. 26, S. 859. — 4) *L. Michaelis* und *P. Rona*, diese Zeitschr. **27**, 38; **28**, 193. — 5) *W. Mestrezat*, C. r. des séanc. de la soc. de biol. **84**, Nr. 8, S. 282, 1921; ref. Kongreßzentralbl. f. inn. Med. **17**, 523. — 6) *L. Michaelis* und *H. Pechstein*, diese Zeitschr. **47**, 260, 1912. – 7) *L. Michaelis*, Prakt. d. physikal. Chem., 2. Aufl., Berlin 1922. – 8) *J. Blum*, Beitr. z. Klin. d. Tuberk. **55**, 106, 1923 und Münch. med. Wochenschr. 1923, Nr. 26, S. 859. — 9) *Ruppel*, Deutsch. med. Wochenschr. 1913, S. 2462 und Zeitschr. f. Immunforsch. **21**, 1914. — 10) *Löwenstein* und *Pick*, diese Zeitschr. **81**. — 11) *L. Michaelis* und *A. v. Szent-Györgyi*, ebendaselbst **108**, 178, 1920. — 12) *W. Fornet*, Deutsch. Arch. f. klin. Med. **138**, 229, 1922. — 13) *A. Wassermann*, Deutsch. med. Wochenschr. 1923, Nr. 10, S. 303. — 14) *Feinschmidt*, diese Zeitschr. **38**, 244, 1912. – 15) *Porges* und *Neubauer*, ebendaselbst **7**, 152, 1908.

Über die Beeinflussung der Senkungsgeschwindigkeit der Erythrocyten durch einige Elektrolyte.

Von

G. Ehrismann.

(Aus der medizinischen Universitätsklinik Greifswald.)

(Eingegangen am 31. Juli 1923.)

Die Senkungsgeschwindigkeit der roten Blutkörperchen ist nach den experimentellen Forschungen der letzten Jahre, die wir besonders der *Höber*schen Schule[1]) verdanken, abhängig von der Größe des elektrischen Adsorptionspotentials, das den Blutkörperchen von den adsorbierbaren Eiweißionen des Plasmas aufgenötigt wird. Die Suspensionslabilität der roten Blutkörperchen wird demgemäß stark beeinflußt werden durch Änderungen des die Zelle umgebenden Milieus. Es war, entsprechend der starken Einflußnahme von Ionen auf Eiweißkörper, daher von vornherein anzunehmen, daß die Senkungsgeschwindigkeit roter Blutkörperchen in einem Elektrolytmilieu wechselnder Ionen sich von der Art der anwesenden Ionen abhängig zeigt.

In Versuchen, die ich auf Anregung von Herrn Prof. *H. Straub* anstellte, sollten diese Ioneneinflüsse näher verfolgt werden.

Untersucht wurden einerseits native und andererseits gewaschene, also in ihren Oberflächenkolloiden beeinflußte rote Blutkörperchen des Menschen. Die Waschung geschah teils mit verschiedenen Elektrolyten, teils mit Anelektrolyten. Geprüft wurden (als Na-Salze) die Anionen CNS, Cl, SO_4, NO_3, Br, J; von den Kationen wurden (als Chloride) untersucht Na, K, Rb, Cs, Mg, Ca, Sr, Ba. Alle Salzlösungen waren möglichst genau auf $\Delta = -0{,}56^0$ eingestellt. Das mittels Aderlaßkanüle aus der Vena cubitalis entnommene Blut wurde durch Schlagen defibriniert und das Serum scharf abzentrifugiert und abgehoben. Darauf kamen die Blutkörperchen in $^1/_{10}$ ccm kalibrierte Senkungsröhrchen von 1 cm Durchmesser und wurden in diesen mit der zu untersuchenden Salzlösung gut umgeschüttelt. Abgelesen wurde nach gegebenen Zeiten die über den gesenkten Blutkörperchen stehende

[1]) *Höber*, Jahreskurse für ärztliche Fortbildung 1923, Januarheft, S. 3.

Flüssigkeitsschicht in Kubikmillimetern. Es erwies sich am vorteilhaftesten, wenn auf 9 ccm Salzlösung 1 ccm Blutkörperchen genommen wurde. Verwendet man mehr Blut, so geht die Senkung langsamer vonstatten und auftretende Unterschiede werden kleiner, nimmt man weniger Blut, so wird die Absetzungslinie der sich senkenden Erythrocyten unscharf, ehe sichere Unterschiede vorhanden sind. Aus dem zuletzt erwähnten Grunde wurde auch die Ablesungsdauer nicht länger als 4 Stunden fortgesetzt.

In kurzen Zügen wiedergegeben, wurden mit dieser Methodik folgende Ergebnisse gewonnen: Wurden native rote Blutkörperchen in Rohrzucker- und in NaCl-Lösung suspendiert, so zeigte sich in der Rohrzuckersuspension die Senkungsgeschwindigkeit um das Zehnfache beschleunigt gegenüber der Senkung in NaCl-Lösung (Tabelle I). In Elektrolytlösungen ergab sich für die Anionen, daß CNS gegenüber Cl beschleunigt auf die Senkung nativer roter Blutkörperchen wirkte, SO_4 und NO_3 mit Cl wirkungsgleich waren, während Br und J die Senkungsgeschwindigkeit verlangsamten. Die Reihe lautet somit, geordnet nach absteigender Senkungsbegünstigung:

$$CNS > NO_3 = SO_4 = Cl > Br > J$$ (Tabellen IV und VIII).

Ein verschiedener Einfluß der Kationen der ersten Reihe des periodischen Systems auf die Senkung war nicht nachzuweisen (Tabelle XII), bei Untersuchung der Kationen der zweiten Reihe des periodischen Systems ergab sich eine deutliche verlangsamende Wirkung dieser Ionen, und zwar nach folgender Reihe (wiederum nach absteigender Senkungsbegünstigung):

$$(Na >)\ Ca > Sr > Ba > Mg$$ (Tabelle XVI).

Die Waschung der roten Blutkörperchen in Elektrolytlösungen erwies sich durchweg von kaum erkennbarem Einfluß auf ihre Senkungsgeschwindigkeit (Tabelle II, V, VI, IX, X, XIII, XIV, XVII und XVIII). Die absoluten Werte der Senkungsgeschwindigkeit dieser Versuchsreihen sind identisch mit denen der letzten Gruppe oder nur innerhalb der bei verschiedenen Blutproben unumgänglichen normalen Schwankungen von ihnen verschieden. Auch die relativen Unterschiede in der Anionen- und Kationenreihe sind mit auffallender Genauigkeit festgehalten. Dabei war es ohne Einfluß, ob die vorherige Waschung in Na_2SO_4, dem nach *Hamburger*[1]) eine die osmotische Resistenz am günstigsten erhaltende Eigenschaft zukommt, oder ob sie in dem späteren Suspensionsmittel erfolgte. Es ist daraus zu schließen, daß die verhältnismäßig kurze Verweildauer der roten Blutkörperchen in dem besonderen Suspensionsmittel, wie sie während der eigentlichen

[1]) *Hamburger*, diese Zeitschr. **129**, 162, 1922.

Senkungsgeschwindigkeitsprüfung stattfindet, durchaus genügt, um das Maximum der spezifischen Ionenwirkung zur Geltung zu bringen. Der einzige und offenbar nicht prinzipielle Unterschied bestand darin, daß nach 4 Stunden die Blutkörperchen sich in $CaCl_2$- und $SrCl_2$-Lösung gleich schnell gesenkt hatten.

Von diesem Verhalten bei der Waschung mit Elektrolytlösungen weicht die Beeinflussung der Senkungsgeschwindigkeit durch Anelektrolytwaschung (mit Rohrzucker) insofern ab, als es unter dem ladungsvermindernden Einfluß der Rohrzuckerwaschung gelingt, auch innerhalb der ersten Reihe des periodischen Systems Unterschiede in der Kationenwirkung herauszubringen. Es findet sich wieder im Sinne absteigender Senkungsbegünstigung geordnet die Reihe: Na $>$ K $>$ Rb $>$ Cs (Tabelle XV).

Es soll der Hinweis nicht unterbleiben, daß in der Ionenfolge nicht die Kationenreihe der *Hofmeister*schen Versuche eingehalten ist, die sich bei so vielen biologischen Vorgängen wiederfindet, sondern die Atomgewichtsreihe erweist sich hier gültig. — Die Reihen bei Rohrzuckerwaschung sind also (nach absteigender Senkungsgeschwindigkeitsbegünstigung):

Rohrzucker $>$ Na (Tabelle III),

$CNS > NO_3 = SO_4 = Cl > Br > J$ (Tabellen VII und XI),

$Na > K > Rb > Ca > Sr > Ba = Cs > Mg$ (Tabellen XV u. XIX).

Ist man nun berechtigt, die gefundenen Reihen lediglich auf physikalisch-chemische Einflüsse zurückzuführen? Kann das wechselnde spezifische Gewicht der einzelnen Lösungen außer acht gelassen werden? Unter Vernachlässigung des Wassergehaltes der verwendeten Substanzen berechnen sich aus den Gewichtsprozenten die Schwankungen des spezifischen Gewichtes für die Anionenreihe in einem Bereich zwischen 1,009 (NaCl) und 1,026 (NaJ), für die Kationenreihe zwischen 1,009 (NaCl) und 1,041 (CsCl). Da die Blutkörperchen nach Analysen *Schmidts* (zitiert nach *Bunge*, Lehrbuch der Physik, 1901) eine Dichtigkeit um 1,088 haben, werden besonders bei den hochatomigen Aufschwemmungsflüssigkeiten die Unterschiede des spezifischen Gewichtes für die Frage der Senkungsgeschwindigkeit sich bemerkbar machen können. Es ist aus der Gültigkeit der Anionenreihe zu erkennen, daß Schwankungen des spezifischen Gewichtes bis 1,026 offenbar in ihrer Größenordnung gegenüber den in Betracht kommenden physikalisch-chemischen Einflüssen vernachlässigt werden können. Umgekehrt wird man die Abweichung der gefundenen Kationenreihe von der *Hofmeister*schen Reihe mit dem größten Schwanken des spezifischen Gewichtes in der Kationenreihe in Beziehung bringen müssen; es ist wahrscheinlich, daß insbesondere die beobachtende Endstellung des Cs auf diese Weise ihre Erklärung findet.

Zusammenfassend kann man also von einer sicheren und typischen Beeinflussung der Senkungsgeschwindigkeit der Erythrocyten durch Anionen und Kationen sprechen. Die zwar kleinen Unterschiede traten auch bei Wiederholung der Versuche stets deutlich hervor und erhoben sich einwandfrei über die methodisch bedingten Schwankungen zwischen einzelnen Versuchen.

Bringt man diese hier gefundenen Beeinflussungen der Senkungsgeschwindigkeit durch Ionen in Zusammenhang mit den von früheren Untersuchern niedergelegten Resultaten, so begegnet man teils gegensätzlichen, teils mehr oder weniger übereinstimmenden Reihen.

György[1]) vermochte einen Einfluß von Elektrolyten und der meisten von ihm verwendeten Anelektrolyte auf die Senkungsreaktion nicht festzustellen. Die Elektrolyte untersuchte er meist in n/7 Lösung. Die Verdünnungen hatte er mit 8proz. Rohrzuckerlösung hergestellt. Er hatte hiermit wohl kein optimales Verhältnis zwischen Erythrocyten und Suspensionsmittel. Demgegenüber konnte *Runnström*[2]), der die Ionenwirkung zur Verstärkung der Agglutination in einem Mannit-Gelatinegemisch beobachtete, eine typische Reihe finden. Nach absteigender Agglutinationsbegünstigung lautet sie: $CNS > J > NO_3 > Br > Cl > SO_4$, wobei SO_4 nicht immer dieselbe Stellung einnahm. Wurde die Menge der Gelatine auf ein Drittel herabgesetzt, so trat eine Umkehrung der Reihe ein. Abweichend von meinen Reihen ist besonders die Stellung des CNS, das bei *Runnström* in entgegengesetzter Richtung von Cl und SO_4 weg zu J hingewandert ist. In isotonischen $CaCl_2$-, $BaCl_2$-, NaCl- und KCl-Lösungen fand *Runnström* keine Unterschiede der Senkungsgeschwindigkeit. *Radsma*[3]), der eine kleine Menge Salzlösung zu Rohrzucker zugab und in diesem Gemisch die Suspensionsstabilität der roten Blutkörperchen beobachtete, konnte – ähnlich wie das bei meinen rohrzuckergewaschenen Blutkörperchen der Fall war – Unterschiede in der Kationenwirkung nachweisen. Seine Reihe zeigt freilich umgekehrte Richtung: vielleicht ist dabei das Mengenverhältnis Rohrzucker : Salzlösung von Bedeutung. Seine Ionenreihe ist mit derjenigen von *Runnström* fast identisch, insbesondere was die Stellung von CNS betrifft. *Raue*[4]) untersuchte die Einwirkung vieler Elektrolyte und Anelektrolyte in verschiedenen Konzentrationen auf die Senkungsgeschwindigkeit der Erythrocyten, wobei er als Suspensionsflüssigkeit meist 5,4proz. Traubenzuckerlösung nahm. Nach dem Grad absteigender Senkungsgeschwindigkeit geordnet, konnte er bei Elektrolyten folgende Reihen aufstellen, wobei ich nur die auch von mir untersuchten Ionen aufführe:

$$SO_4 > Br = NO_3 > Cl > J$$
$$K > Na > Ca > Ba > Mg.$$

Die Unterschiede gegenüber meinen Ergebnissen sind in der Anionenreihe nur geringfügig, in der Kationenreihe zeigt sich eine Umstellung bei Na und K.

[1]) *György*, diese Zeitschr. **115**, 71, 1921.
[2]) *Runnström*, ebendaselbst **123**, 1, 1921.
[3]) *Radsma*, ebendaselbst **89**, 211, 1918.
[4]) *Raue*, Arch. f. exper. Path. u. Pharm. **92**, 150, 1922.

Die Unterschiede, die im vorstehenden aufgeführt sind, dürften weitgehend erklärt werden können durch Verschiedenheiten der Blutarten und Suspensionsgemische, insbesondere durch die recht verschiedenen angewendeten Anelektrolyte, sowie durch das sehr wechselnde Verhältnis der Anelektrolytbeimischungen zu der zu prüfenden Elektrolytlösung. Man wird nicht fehlgehen, wenn man, entsprechend der erwähnten Untersuchungen der *Höber*schen Schule, den Ort der spezifischen Ionenwirkung auf die Suspensionsstabilität der roten Blutkörperchen in ihren Oberflächenschichten sucht und die Art ihrer Wirksamkeit in einer Beeinflussung des Adsorptionspotentials der Zellen vermutet. Der Einfluß des spezifischen Gewichtes der Suspensionsflüssigkeit auf die Senkungsgeschwindigkeit der roten Blutkörperchen kommt erst bei stärkeren Abweichungen des spezifischen Gewichtes von demjenigen der physiologischen NaCl-Lösung zur Geltung.

Protokolle.

Tabelle I.

1 ccm Blutkörperchen + 9 ccm Lösung.

Zeit	Rohrzucker	NaCl	Zeit	Rohrzucker	NaCl
0′	0	0	6′	3,5	0
2	1	0	8	5	0
4	2	0	10	6	0,5

Tabelle II.

1 ccm Blutkörperchen in Na_2SO_4-Lösung gewaschen + 9 ccm Lösung.

Zeit	Rohrzucker	NaCl	Zeit	Rohrzucker	NaCl
0′	0	0	6′	3,5	0
2	1	0	8	5	0
4	2	0	10	6	0,5

Tabelle III.

1 ccm Blutkörperchen in Rohrzuckerlösung gewaschen + 9 ccm Lösung.

Zeit	Rohrzucker	NaCl	Zeit	Rohrzucker	NaCl
0′	0	0	6′	3,5	0
2	1	0	8	5	0
4	2	0	10	6	0,5

Tabelle IV.
1 ccm Blutkörperchen + 9 ccm Salzlösung.

Zeit	NaCl	NaBr	NaJ	NaCNS	Zeit	NaCl	NaBr	NaJ	NaCNS
0′	0	0	0	0	2h 20′	11	9,5	8	12
20	1	1	1	1,5	2 40	12	11	9	13,5
40	3	2	2	3,5	3	13	12	10	15
1h	4,5	3	3	5	3 20	14	13	11	16
1 20	6	5	4,5	6,5	3 40	15	14	12	17
1 40	7,5	6	5,5	8,5	4	16	15	13	18
2	9	7,5	6,5	10					

Tabelle V.
1 ccm Blutkörperchen in Na_2SO_4-Lösung gewaschen + 9 ccm Salzlösung.

Zeit	NaCl	NaBr	NaJ	NaCNS	Zeit	NaCl	NaBr	NaJ	NaCNS
0′	0	0	0	0	2h 20′	9,5	8,5	7,5	11
20	1	1	1	1,5	2 40	11	10	9	12,5
40	2,5	2	2	3	3	12	11	10	13,5
1h	3,5	3	3	4,5	3 20	13,5	12,5	11	15
1 20	5	4,5	4	6	3 40	14,5	13,5	12	16
1 40	6,5	5,5	5	7,5	4	15,5	14,5	13,5	17,5
2	8	7	6,5	9					

Tabelle VI.
1 ccm Blutkörperchen in der betreffenden Salzlösung gewaschen + 9 ccm Salzlösung.

Zeit	NaCl	NaBr	NaJ	NaCNS	Zeit	NaCl	NaBr	NaJ	NaCNS
0′	0	0	0	0	2h 20′	10,5	9,5	8	12
20	1	1	1	1,5	2 40	11,5	11	9,5	13
40	2,5	2	2	3,5	3	13	12	10,5	14,5
1h	4	3,5	3	5	3 20	14	13	11,5	15,5
1 20	5,5	4,5	4,5	6,5	3 40	15	14	12,5	17
1 40	7	6	5,5	8,5	4	16	15	13,5	18
2	8,5	7,5	6,5	10					

Tabelle VII.
1 ccm Blutkörperchen in Rohrzuckerlösung gewaschen + 9 ccm Salzlösung.

Zeit	NaCl	NaBr	NaJ	NaCNS	Zeit	NaCl	NaBr	NaJ	NaCNS
0′	0	0	0	0	2h 20′	9,5	8,5	7,5	10,5
20	1	1	1	1	2 40	11	10	9	11,5
40	2	2	2	2,5	3	12	11,5	10,5	13
1h	3	3	3	4	3 20	13,5	12,5	11,5	14
1 20	4,5	4	4	6	3 40	14,5	13	12,5	16,5
1 40	6,5	5,5	5	7,5	4	16	14,5	13,5	17,5
2	8	7	6,5	9,5					

Tabelle VIII.

1 ccm Blutkörperchen + 9 ccm Salzlösung.

Zeit	NaCl	Na_2SO_4	$NaNO_3$	NaCNS	Zeit	NaCl	Na_2SO_4	$NaNO_3$	NaCNS
0′	0	0	0	0	2h 20′	11	11	11	12
20	1	1	1	1,5	2 40	12	12	12	14
40	2,5	2,5	2,5	3,5	3	13	13	13	15,5
1h	4,5	4,5	4,5	5	3 20	14	14	14	16
1 20	6	6	6	6,5	3 40	15	15	15	17
1 40	7,5	7,5	7,5	8,5	4	16	16	16	18
2	9	9	9	10					

Tabelle IX.

1 ccm Blutkörperchen in Na_2SO_4-Lösung gewaschen + 9 ccm Salzlösung.

Zeit	NaCl	Na_2SO_4	$NaNO_3$	NaCNS	Zeit	NaCl	Na_2SO_4	$NaNO_3$	NaCNS
0′	0	0	0	0	2h 20′	11	11	11	12,5
20	1	1	1	1,5	2 40	12	12	12	14
40	2,5	2,5	2,5	3,5	3	13	13	13	15
1h	4,5	4,5	4,5	5	3 20	14	14	14	16
1 20	6	6	6	7	3 40	15	15	15	17
1 40	8	8	8	9	4	16	16	16	18
2	9	9	9	10,5					

Tabelle X.

1 ccm Blutkörperchen in der betreffenden Salzlösung gewaschen + 9 ccm Salzlösung.

Zeit	NaCl	Na_2SO_4	$NaNO_3$	NaCNS	Zeit	NaCl	Na_2SO_4	$NaNO_3$	NaCNS
0′	0	0	0	0	2h 20′	11	11	11	12,5
20	1	1	1	1,5	2 40	12	12	12	14
40	2,5	2,5	2,5	3,5	3	13	13	13	15
1h	4,5	4,5	4,5	5	3 20	14	14	14	16
1 20	6	6	6	7	3 40	15	15	15	17
1 40	8	8	8	9	4	16	16	16	18
2	9	9	9	10,5					

Tabelle XI.

1 ccm Blutkörperchen in Rohrzuckerlösung gewaschen + 9 ccm Salzlösung.

Zeit	NaCl	Na_2SO_4	$NaNO_3$	NaCNS	Zeit	NaCl	Na_2SO_4	$NaNO_3$	NaCNS
0′	0	0	0	0	2h 20′	10,5	10,5	10,5	11,5
20	1	1	1	1	2 40	11,5	11,5	11,5	13
40	2,5	2,5	2,5	3	3	12,5	12,5	12,5	14,5
1h	4,5	4,5	4,5	5	3 20	14	14	14	16
1 20	6	6	6	7	3 40	15	15	15	17
1 40	8	8	8	9	4	16	16	16	18
2	9,5	9,5	9,5	10,5					

Tabelle XII.
1 ccm Blutkörperchen + 9 ccm Salzlösung.

Zeit	NaCl	KCl	RbCl	CsCl	Zeit	NaCl	KCl	RbCl	CsCl
0′	0	0	0	0	2h 20′	11	11	11	11
20	1	1	1	1	2 40	12	12	12	12
40	2,5	2,5	2,5	2,5	3	13	13	13	13
1h	4,5	4,5	4,5	4,5	3 20	14	14	14	14
1 20	6	6	6	6	3 40	15	15	15	15
1 40	7,5	7,5	7,5	7,5	4	16	16	16	16
2	9	9	9	9					

Tabelle XIII.
1 ccm Blutkörperchen in Na_2SO_4-Lösung gewaschen + 9 ccm Salzlösung.

Zeit	NaCl	KCl	RbCl	CsCl	Zeit	NaCl	KCl	RbCl	CsCl
0′	0	0	0	0	2h 20′	11	11	11	11
20	1	1	1	1	2 40	12	12	12	12
40	2,5	2,5	2,5	2,5	3	13	13	13	13
1h	4,5	4,5	4,5	4,5	3 20	14	14	14	14
1 20	6	6	6	6	3 40	15	15	15	15
1 40	7,5	7,5	7,5	7,5	4	16	16	16	16
2	9	9	9	9					

Tabelle XIV.
1 ccm Blutkörperchen in der betreffenden Salzlösung gewaschen + 9 ccm Salzlösung.

Zeit	NaCl	KCl	RbCl	CsCl	Zeit	NaCl	KCl	RbCl	CsCl
0′	0	0	0	0	2h 20′	11	11	11	11
20	1	1	1	1	2 40	12	12	12	12
40	2,5	2,5	2,5	2,5	3	13	13	13	13
1h	4,5	4,5	4,5	4,5	3 20	14	14	14	14
1 20	6	6	6	6	3 40	15	15	15	15
1 40	7,5	7,5	7,5	7,5	4	16	16	16	16
2	9	9	9	9					

Tabelle XV.
1 ccm Blutkörperchen in Rohrzuckerlösung gewaschen + 9 ccm Salzlösung.

Zeit	NaCl	KCl	RbCl	CsCl	Zeit	NaCl	KCl	RbCl	CsCl
0′	0	0	0	0	2h 20′	10,5	9,5	9	8
20	1	1	1	1	2 20	11,5	10,5	10	9
40	2,5	2,5	2,5	1,5	3	12,5	11,5	11	10
1h	4,5	4,5	4	3,5	3 20	14	13	12	11
1 20	6	5,5	5	4,5	3 40	15	14	13	12
1 40	7,5	7	6,5	6	4	16	15	14	13
2	9	8,5	8	7					

Tabelle XVI.
1 ccm Blutkörperchen + 9 ccm Salzlösung.

Zeit	Na Cl	Mg Cl_2	Ca Cl_2	Sr Cl_2	Ba Cl_2	Zeit	Na Cl	Mg Cl_2	Ca Cl_2	Sr Cl_2	Ba Cl_2
0′	0	0	0	0	0	2h 20′	9,5	7	7,5	7	7
20	1	1	1	1	1	2 40	11	8	8,5	8	8
40	2	2	2	2	2	3	12	9	10	9,5	9
1h	3	3	3	3	3	3 20	13,5	10	11,5	11	10,5
1 20	4,5	4,5	4,5	4	4	3 40	14,5	11	12,5	12,5	11,5
1 40	6,5	5	5,5	5	5	4	16	11,5	14	13,5	12,5
2	8	6	6,5	6	6						

Tabelle XVII.
1 ccm Blutkörperchen in Na_2SO_4-Lösung gewaschen + 9 ccm Salzlösung.

Zeit	Na Cl	Mg Cl_2	Ca Cl_2	Sr Cl_2	Ba Cl_2	Zeit	Na Cl	Mg Cl_2	Ca Cl_2	Sr Cl_2	Ba Cl_2
0′	0	0	0	0	0	2h 20′	8,5	6,5	7,5	7	7,5
20	1	1	1	1	1	2 40	10	7	8,5	8	8,5
40	2	2	2	2	2	3	11,5	8	10	9,5	9,5
1h	3	2,5	3	3	3	3 20	12,5	9	11,5	10	10,5
1 20	4,5	3,5	4,5	4	4	3 40	14,5	10	12,5	12	11,5
1 40	6	4,5	5,5	5	5	4	16	11	14	13,5	12
2	7	5,5	6,5	6	6,5						

Tabelle XVIII.
1 ccm Blutkörperchen in der betreffenden Salzlösung gewaschen + 9 ccm Salzlösung.

Zeit	Na Cl	Mg Cl_2	Ca Cl_2	Sr Cl_2	Ba Cl_2	Zeit	Na Cl	Mg Cl_2	Ca Cl_2	Sr Cl_2	Ba Cl_2
0′	0	0	0	0	0	2h 20′	9,5	6,5	7,5	6,5	8
20	1	1	1	1	1	2 40	11	7,5	8,5	9	9
40	2	2	2	2	2	3	12	8,5	10	10	10
1h	3	3	3	3	3,5	3 20	13,5	9,5	11,5	11	11
1 20	4,5	4	4,5	4	4,5	3 40	14,5	10,5	12,5	12,5	12
1 40	6	5	5,5	5	6	4	16	12	14	14	12,5
2	8	6	6,5	6	7						

Tabelle XIX.
1 ccm Blutkörperchen in Rohrzuckerlösung gewaschen + 9 ccm Salzlösung.

Zeit	Na Cl	Mg Cl_2	Ca Cl_2	Sr Cl_2	Ba Cl_2	Zeit	Na Cl	Mg Cl_2	Ca Cl_2	Sr Cl_2	Ba Cl_2
0′	0	0	0	0	0	2h 20′	9,5	6,5	7,5	8	7,5
20	1	1	1	1	1	2 40	11	7,5	8,5	9	8,5
40	2	2	2	2	2	3	12,5	8,5	10	10	10
1h	4	3	3	3	3	3 20	13,5	9,5	11,5	11	11
1 20	5	4	4,5	4	4	3 40	15	10,5	12,5	12,5	12
1 40	6,5	5	5,5	5	5,5	4	16	12	14	14	13
2	8	6	6,5	6	6,5						

Zur Frage einer potenzierten Giftwirkung von Schwefelkohlenstoff-Schwefelwasserstoffgasgemischen.

Von

Richard Fischer.

(Aus dem pharmakologischen Institut der Universität Berlin.)

(Eingegangen am 31. Juli 1923.)

Durch die im folgenden beschriebenen experimentellen Untersuchungen war die Frage zu beantworten, ob bei der Einwirkung bestimmter Gasgemische auf den tierischen Organismus die Giftigkeit der einzelnen Komponenten dieser Mischungen erhöht wird. Von einigen Arzneimitteln und Giften sind solche Potenzierungen bekannt. So berichtet z. B. *Fühner*[1]) über derartige Beobachtungen, und *Koelsch*[2]) bezieht sich in einem Sammelreferat über gewerbliche Vergiftungen auf diese Arbeit *Fühners* mit dem Hinweis auf die gewerbehygienische Bedeutung solcher Zusammenwirkungen in industriellen Betrieben. Daß Untersuchungen nach dieser Richtung hin mit Gasen angestellt worden sind, ist nicht zu unserer Kenntnis gekommen.

Wir haben zwei Gase gewählt, deren toxische Eigenschaften durch experimentelle Untersuchungen im einzelnen bekannt sind: Schwefelwasserstoff und Schwefelkohlenstoff. Über beide Körper liegen unter anderem ausführliche Arbeiten von *K. B. Lehmann*, Würzburg[3]), vor, auf die an dieser Stelle besonders hingewiesen sei, weil wir uns später häufig darauf beziehen werden; ebenda finden sich auch zahlreiche Literaturhinweise auf früher erschienene Arbeiten. Uns sind in der Literatur nur zwei Stellen bekannt geworden, die auf eine Wirkung von Gasgemischen auf den Organismus hindeuten. Die eine Angabe findet sich bei *Lehmann* in seiner Arbeit über CO_2 auf S. 73, wo er sagt: „... wenn ich auch theoretisch zugeben kann, daß *vielleicht* die Giftigkeit von Schwefelkohlenstoff durch einen *bedeutenden* Gehalt an Schwefelwasserstoff noch *etwas* gesteigert werden könnte". *Lehmann*

---

1) Münch. med. Wochenschr. 1922, Nr. 25, S. 915.
2) Ebendaselbst Nr. 48, S. 1671.
3) *K. B. Lehmann*, Arch. f. Hyg. **14**, 135ff., 1892; **20**, 26ff., 1894.

nimmt also zu dieser Frage sehr vorsichtig und, wie wir sehen werden, mit Recht, Stellung. Die zweite Angabe macht *Zangger*[1]): „Die Erhöhung der Giftigkeit bestimmter Stoffe durch andere ist eine Tatsache, die heute viel zu wenig berücksichtigt wird, trotzdem die physikalisch-chemischen Untersuchungen über Diffusionserhöhungen solche Veränderungen durch dritte Stoffe unzweifelhaft nachweisen lassen." Im folgenden bezieht er sich auf derartige Potenzierungen bei Gemischen von CO_2 und CO, sowie CO_2 und H_2S. Uns sind, wie bereits oben erwähnt, andere derartige, sich auf Gasmischungen beziehende Arbeiten nicht bekannt.

Die Versuchsanordnung.

Die von uns benutzte Versuchsanordnung, die sich, was die Zuführung von CS_2-Dämpfen anbetrifft, an die *Lehmann*sche Methodik hält, war folgende:

Der Frischluftstrom wurde nach Passage einer Gasuhr durch ein *Y*-Rohr geteilt. Der eine, engere Schenkel dieses Stromes, dessen Weite noch durch eine Schraubklemme reguliert werden konnte, wurde durch einen bis zur Hälfte mit CS_2 angefüllten Kolben geleitet, den er mit CS_2-Dämpfen beladen wieder verließ. Dieser Kolben war in gekühltes Wasser von konstant gehaltener Temperatur eingestellt, so daß einmal durch die hierdurch bedingte gleichmäßige Verdunstung des CS_2, dann aber auch durch das weitere Schließen oder Öffnen der oben erwähnten Schraubklemme eine möglichst gleichbleibende Zuführung von CS_2-Dämpfen gewährleistet war. Außerdem wurde es durch diese Versuchsanordnung ermöglicht, bei Kontrollversuchen immer die gleiche Menge CS_2 zur Verdunstung zu bringen. Durch den weiteren Schenkel des geteilten Frischluftstromes wurde die reine Luft geleitet. Kurz vor der Wiedervereinigung des Frischluftstromes mit dem CS_2-Dampfstrom wurde der H_2S durch ein *Y*-Rohr zugeführt; unmittelbar hiernach erfolgte die Überleitung der so kombinierten Gase in eine Glasglocke von 28 Liter Inhalt. Ein im Dach der Glocke angebrachter, elektrisch betriebener Ventilator sorgte für gründliche Verteilung der Luft im Glockeninnern. Der H_2S wurde im *Kipp*schen Apparat in bekannter Weise dargestellt und nach Überleitung in eine Gasbürette durch H_2S-Wasser aus dieser in genau abzulesender Menge in das Rohrsystem getrieben. An anderer Stelle[2]) ist diese die H_2S-Zuführung betreffende Apparatur genau beschrieben und illustriert, nur hat man in unserem Falle an Stelle des dort beschriebenen Gasometers den *Kipp*schen Apparat und als Steigflüssigkeit in der Gasbürette (Inhalt der *Mariotte*schen Flasche) H_2S-Wasser zu setzen.

Zur Bestimmung des Prozentgehalts der Luft an CS_2 wird das Gewicht des mit Schwefelkohlenstoff gefüllten Kolbens unmittelbar vor und nach dem Versuch (nach sorgfältigem Abtrocknen) auf der analytischen Wage festgestellt. Der Korkstopfen, welcher nach Behandlung mit Paraffin sehr gut schloß, wurde dabei auf dem Kolben belassen und samt den ihn durchbohrenden zwei Glasröhren mitgewogen, um die Fehlerquellen durch Ver-

---

[1]) Ergebn. d. inn. Med. u. Kinderheilk. 5, 1910, S. 51 des Sonderabdrucks.

[2]) *R. Fischer*, diese Zeitschr. **125**, 17.

dunsten des CS_2 aus der relativ weiten Kolbenöffnung möglichst zu reduzieren. Die Differenz des Gewichts vor und nach dem Versuch ergibt die Menge des verdunsteten CS_2. Hieraus, sowie aus der durch die Gasuhr angegebenen Literzahl Luft läßt sich der Prozentgehalt durch Division berechnen. Der H_2S-Gehalt kann ebenfalls in einfacher Weise aus der Anzahl der verbrauchten Kubikzentimeter H_2S, wie sie die Skala der Gasbürette anzeigt, und der Literzahl der Luft ermittelt werden. Luftanalysen, wie sie *Lehmann* angestellt hat, wurden nicht vorgenommen. Seine Resultate stimmen aber mit den unseren, wie unten gezeigt werden wird, gut überein, so daß wesentliche Fehlerquellen bei unserer Versuchsanordnung nicht bestehen dürften.

Die Tierversuche.

Die Anordnung der Tierversuche, bei denen mir Herr Professor Dr. *Joachimoglu* durch seinen Rat wertvolle Unterstützung lieh, wofür ich ihm an dieser Stelle meinen ergebensten Dank ausspreche, war folgende:

Drei Kaninchen gehörten jedesmal zu einer Versuchsgruppe. Von diesen Tieren wurde eins mit H_2S, das zweite mit CS_2 und das dritte mit einem Gemisch behandelt, welches diese Komponenten in möglichst gleicher Menge enthielt. Derartige Versuchsgruppen wurden nun bei steigenden Konzentrationen aufgestellt. Traten nach weniger als 3 Stunden bei dem Versuchstier bedrohliche Erscheinungen (Kollaps) auf, dann wurde der Versuch abgebrochen und dieses Anzeichen der Giftwirkung, sowie die Zeit bis zu seinem Eintritt als Maß für die Intoxikation genommen, wobei es selbstverständlich erscheint, daß man im Hinblick auf die Individualität eines jeden Organismus bei der Festsetzung dieses Maßes eine gewisse Breite desselben annehmen muß. Es wäre noch nachzutragen, daß fast durchweg für jeden Versuch frische Tiere verwandt wurden; war dies in Einzelfällen nicht möglich, so lag zwischen der wiederholten Verwendung eine Ruhezeit von mindestens 3 Wochen. Eine mehr als zweimalige Verwendung eines Tieres fand nicht statt. Es folgen nun die einzelnen Versuchsgruppen, nach steigenden Konzentrationen geordnet.

Gruppe I.

Tier	Datum	Gas	Konzentration	Dauer in Min.	Symptome während des Versuchs	Symptome nach d. Versuch
VI. (2,05 kg)	10. XI. 1921	H_2S	0,240 Prom.	180	Nach 60 Minuten öfter Kaubewegungen, nach 150 Minuten desgleich., zuweilen Lecken der Schnauze (und kurz andauernde, geringe Unruhe)	Keine
V. (2,17 kg)	9. XI. 1921	CS_2	3,1 mg im Liter	180	Außer bisweilen auftretendem Lecken der Schnauze und Kaubewegung, keine Symptome. Seit der 105. Minute etwas schläfrig.	Keine
III. (2,03 kg)	8. XI. 1921	H_2S CS_2	0,254 Prom. 2,84 mg	180	Nach 116 Minuten etwas schläfrig, vorher zuweilen Lecken der Schnauze. Nach 135 Minuten geringe Unruhe, hiernach wieder Schläfrigkeit	Keine

Gruppe I. (Fortsetzung.)

Tier	Datum	Gas	Konzentration	Dauer in Min.	Symptome während des Versuchs	Symptome nach d. Versuch
			K. B. Lehmann.			
Seite 159 Übersichtstabelle II		H_2S	0,21 Prom.	—	Bei Versuchsdauer von 8 Stunden, außer Dyspnoe, keine nennenswerten Störungen	Keine
Seite 55 Übersichtstabelle II		CS_2	2,64 mg im Liter	—	Keine wesentlichen Störungen bei Versuchsdauer von 9 Stunden	
			Gruppe II.			
II. (1,8 kg)	24. X. 1921	H_2S	0,425 Prom.	180	Lecken der Schnauze, Kaubewegungen. Verminderung der Atemfrequenz. Zieht gegen Ende des Versuches öfter den Kopf in den Nacken	Keine
IV. (2,15 kg)	4. XI. 1921	CS_2	4,98 mg	180	Gegen Ende d. Versuches vereinzelt Lecken der Schnauze und Kaubewegungen	Keine
I. (1,9 kg)	14. XI. 1921	H_2S CS_2	0,484 Prom. 4,81 mg	180	Kaubewegungen, Lecken der Schnauze; gegen Ende des Versuches Anzeichen geringer Dyspnoe und Andeutungen von leichtem Opisthotonus	Keine
			K. B. Lehmann.			
Seite 159 Übersichtstabelle II		H_2S	0,47 Prom.	375	In den ersten Stunden Absinken der Atemfrequenz. In d. letzten Stunde zunehmende Dyspnoe, d. Bestreben sich aufzurichten, Exitus	
		H_2S	0,45 Prom.	160	Erste 2 Stunden ruhig, b. abnehmender Atemfrequenz. Dann krampfhaftes Aufrichten und folgende Krämpfe	Sehr langsam. Erholung. Noch nach 30 Std. schwere Reizerscheinungen
Seite 55 Übersichtstabelle II		CS_2	4,7 mg	180	Keine wesentlichen Störungen	Keine
			4,3 mg	180	Etwas Unruhe, Lecken der Schnauze, nachher etwas Schwanken	Keine
			Gruppe III.			
V. (2,05 kg)	13. X. 1921	H_2S	0,442 Prom.	180	Abnahme der Atemfrequenz von 52 auf 24 innerhalb 2 Stunden, Lecken der Schnauze, zuweilen Zukneifen der Augen. In den letzten 15 Minuten Atmung 48, bei jedem Atemzug wird der Kopf etwas vorgestreckt u. d. Maul geöffnet. Andeutung von Opisthotonus	Atmung einige Stunden etwas röchelnd, im übrigen kein krankhafter Befund
VIII. (2,20 kg)	11. X. 1921	CS_2	7,22 mg	180	Innerhalb der ersten 2 Std. zuweilen Lecken der Schnauze, Kaubewegungen und geringe kurz andauernde Unruhe. In der letzten Stunde sitzt das Tier schläfrig da	Keine

Gruppe III. (Fortsetzung.)

Tier	Datum	Gas	Konzentration	Dauer in Min.	Symptome während des Versuchs	Symptome nach d. Versuch
VI. (1,85 kg)	15. X. 1921	H_2S CS_2	0,493 Prom. 8,21 mg	180	Innerhalb der ersten 165 Minuten Lecken der Schnauze, Kau- bewegungen, geringe Unruhe und zuletzt Vorstrecken d. Kopfes und Öffnen des Maules bei jedem Atemzug. In den letzten 15 Min. sitzt das Tier mit auf- gestützten Vorder- pfoten und erhobenem Kopf da. Atmung wie oben.	Nach 1½ Stunden ist das Tier noch etwas dyspnöisch
K. B. Lehmann.						
		H_2S	0,43 Prom. 0,47 Prom.		Siehe Gruppe II	
Seite 56 Übersichts- tabelle II		CS_2	7,6 mg	3h 30′	Nach 1½ Std. leichtes, nach 2 Std. stärkeres Schwanken, dann Seitenlage, leichte Kon- vulsionen, schließlich schlaffe Seitenlage	Nach 1 Stunde Erholung
			7,44 mg	3h 10′	Nach ½ Stunde etwas Schwanken, nach 40 Minuten verdrehte Seitenlage, aus der es sich nur noch einmal für einen Moment auf- richtet	Erholt sich ziem- lich rasch

Gruppe IV.

Tier	Datum	Gas	Konzentration	Dauer in Min.	Symptome während des Versuchs	Symptome nach d. Versuch
IV. (1,8 kg)	22. IX. 1921	H_2S	0,5 Prom.	99	In den ersten 20 Minuten Beschleunigung der At- mung, Lecken und Wischen der Schnauze. Dann Abnahme der Atemfrequenz und ruhiges Verhalten	Keine
I. (2 kg)	13. IX. 1921	CS_2	13,1 mg	97	In der ersten Stunde Lecken der Schnauze, frequent. Atmung (270). Dann zunehmende Be- nommenheit, Schwan- kungen, Unruhe, Opis- thotonus, Dyspnoe, Zittern, Seitenlage	Unvermögen zu laufen. In 30 Minuten Er- holung
VII. (1,9 kg)	27. X. 1921	H_2S CS_2	0,54 Prom. 13,5 mg	95	Nach 1 Stunde Dyspnoe und Andeutung von Opisthotonus. Dann allmählich stärker wer- dende Unruhe, Schwan- kungen, Krämpfe, Seitenlage. Schnappende Atmung	Unvermögen zu laufen. Reflexe lebhaft. Beim Hochheben to- nisch. Krämpfe Atmung bessert sich. In 40 Min. Erholung
K. B. Lehmann.						
		H_2S	0,73 Prom. 0,47 Prom.		Siehe Gruppe II	
		CS_2	10,4 mg	180	Nach 75 Minuten keine Störung, nach 90 Min. Schwankungen, nach 100 Minuten Seitenlage, die nicht mehr ver- ändert wird. Nach 3 Stunden Atmung 26, Tier reflexlos	Erholt sich ziem- lich rasch

Gruppe V.

Tier	Datum	Gas	Konzentration	Dauer in Min.	Symptome während des Versuchs	Symptome nach d. Versuch
II. (2 kg)	16. IX. 1921	H_2S	0,78 Prom.	110	Innerhalb der ersten Stunde zuweilen Lecken der Schnauze und bald vorübergehende leichte Unruhe. Nach der ersten Stunde abwechselnd stärkere Unruhe und ruhiges Dasitzen. Etwas Dyspnoe	Nach einiger Zeit etwas dyspnoisch, dann völlige Erholung
I. (2 kg)	13. IX. 1921	CS_2	13,1 mg	97	In der ersten Stunde Lecken der Schnauze, frequent. Atmung (270). Dann zunehmende Benommenheit, Schwankungen, Unruhe, Opisthotonus, Dyspnoe, Zittern, Seitenlage	Unvermögen zu laufen. In 1/2 Stde. Erholung
III. (1,98 kg)	20. IX. 1921	H_2S CS_2	0,70 Prom 14,2 mg	110	Zunächst Lecken der Schnauze, Kaubewegungen, zuweilen Unruhe u. Benommenheit, dann Schwankungen, Abnahme der Atemfrequenz. Opisthotonus, Zittern, Seitenlage	Verlangsamt. Reflexe. Unvermögen zu laufen. Atmung röchelnd. Beim Hochheben d. Tieres tonisch. Krämpfe. Erholung innerhalb v. $1^1/_2$ Std.

K. B. Lehmann.

Tier	Datum	Gas	Konzentration	Dauer in Min.	Symptome während des Versuchs	Symptome nach d. Versuch
Seite 159—160 · Übersichtstabelle II		H_2S	0,75 Prom.	265	Nach 40 Minuten Dyspnoe, nach 4 Stunden unter einigem Schwanken Umsinken auf die Seite. Tod nach starker Dyspnoe und einigen tonischen Zuckungen im Opisthotonus	
		H_2S	0,71 Prom.	230	Nach $2^1/_2$ Stunden Dyspnoe, nach 3 Stunden 10 Minuten Wälzbewegungen, ruhiges Daliegen, Konvulsionen angedeutet. Exitus	
		H_2S	0,76 Prom.	10	Nach 2 Minuten Wälzbewegungen, Nystagmus. Nach 10 Min. unvermögend sich aufzurichten	Erholung innerhalb 1 Stunde
		CS_2	10,4 mg		Siehe Gruppe IV	

Zunächst sollen die Versuchsgruppen einzeln betrachtet und dann zusammenfassend beurteilt werden.

In *Gruppe I* zeigen die Versuchstiere sowohl bei dreistündiger H_2S- wie CS_2-Einwirkung (0,24 Prom. bzw. 3,1 mg) keine wesentlichen Symptome. Bei H_2S überwiegen vielleicht die Reizerscheinungen (Kaubewegungen, Lecken, etwas Unruhe) um ein geringes. Bei CS_2 dagegen macht sich im letzten Drittel des Versuches eine geringe Schläfrigkeit bemerkbar. Wesentliche Erscheinungen traten jedenfalls nicht auf, Nachwirkungen überhaupt nicht. Die *Lehmann*schen Befunde bei entsprechenden Dosen decken sich mit unseren Resultaten.

Bei der Kombination beider Gase finden wir die Wirkungsweise der einzelnen Komponenten addiert, d. h. der leicht narkotische Einfluß des CS_2 wird zuweilen von der Reizwirkung des H_2S unterbrochen.

In *Gruppe II* traten bei H_2S-Einwirkung (0,425 Prom. 3 Stunden lang) deutliche Anzeichen einer Vergiftung auf, so Herabsetzung der Atemfrequenz, Andeutungen von Opisthotonus. CS_2 zeigte bei 4,98 mg im Liter Luft nur gegen Ende des Versuches geringe Anzeichen einer Einwirkung (Lecken der Schnauze, Kaubewegungen). Die Mischung beider Gase wirkte fast ebenso wie H_2S allein. Auch hier hat eine Potenzierung nicht stattgefunden. Auf eine Addition läßt vielleicht das Auftreten von geringer Dyspnoe schließen. Nachwirkungen traten nach allen drei Versuchen nicht auf. Von den entsprechenden Versuchen *Lehmanns* zeigt bei H_2S der eine (0,47 Prom.) die gleichen von uns gefundenen Symptome in den ersten Stunden. (Bei sechsstündiger Versuchsdauer, d. h. bei doppelt so langer Einwirkung trat Exitus auf.) Ein zweites Versuchstier *Lehmanns* zeigte bei 0,45 Prom. in den ersten 2 Stunden ein ähnliches Verhalten, nach 160 Minuten traten Krämpfe auf. Die Erholung ging bei diesem Tiere sehr langsam vor sich. Daß sich auch unsere Versuchstiere nicht mehr weit von diesem Krampfstadium befanden, darauf wiesen die Andeutungen von Opisthotonus sowohl im H_2S- wie im $H_2S + CS_2$-Versuch hin. Die Resultate von *Lehmanns* CS_2-Versuchen bei einem Gehalt von 4,7 und 4,3 mg CS_2 im Liter Luft ergaben bei einer Versuchsdauer von 3 Stunden geringe Unruhe, Lecken, nachher etwas Schwanken; keine Nachwirkungen. Mit Ausnahme des Schwankens haben auch wir bei entsprechender Dosis dieselben Erscheinungen angetroffen.

Die Einwirkungsdauer bei der dritten Versuchsgruppe betrug ebenfalls 3 Stunden. Bei einem H_2S-Gehalt von 0,44 Prom. traten Verminderung der Atemfrequenz und Reizerscheinungen, wie Lecken der Schnauze und Zukneifen der Augen, auf. In den letzten 15 Minuten des Versuches wurde Dyspnoe und Andeutung von Opisthotonus beobachtet. CS_2 bewirkte in einer Konzentration von 7,12 mg im Liter Luft innerhalb der ersten 2 Stunden nur geringe Reizerscheinungen (Lecken der Schnauze, Kaubewegungen und etwas Unruhe). In der dritten Stunde macht sich eine narkotische Wirkung bemerkbar.

Die Mischung beider Gase ruft Symptome hervor, die denjenigen der reinen H_2S-Wirkung fast völlig gleichen. Die heftigen, durch H_2S bedingten Reizerscheinungen überdecken die narkotischen Eigenschaften des CS_2 völlig. Eine Andeutung dieser prävalierenden Reizwirkung fanden wir schon bei Gruppe I. Als Nachwirkung war bei H_2S und bei $H_2S + CS_2$ eine wenige Stunden anhaltende geringe Dyspnoe zu verzeichnen. Das dem CS_2 allein ausgesetzte Tier zeigte nach dem Versuche normales Verhalten.

Für die der *Gruppe III* entsprechenden *Lehmann*schen Versuchsergebnisse gilt hinsichtlich des H_2S das bei Gruppe II erwähnte. Die CS_2-Einwirkung war nach *Lehmann* eine intensivere. Stärkeres Schwanken, Seitenlage und Konvulsionen haben wir nicht beobachten können; die Erholung auf diese recht schweren Erscheinungen erfolgte relativ schnell.

In *Gruppe IV* wurde zuerst von der Innehaltung einer dreistündigen Beobachtungszeit abgesehen, da bereits nach 97 Minuten währender Einwirkung eines CS_2-Gehaltes von 13,1 mg im Liter Luft bedenkliche Symptome auftraten (Opisthotonus, Zittern, Seitenlage und anderes). Diese Intoxikationserscheinungen sowie die Zeit bis zu ihrem Auftreten mußten beim vergleichenden Versuche mit den gemischten Gasen als empfindlicherer Gradmesser betrachtet werden als die Feststellung des im dreistündigen Versuche etwa erfolgten Exitus; außerdem lassen sich bei jener Methode auch noch die Nachwirkungen vergleichsweise verwerten. Die angewandte H_2S-Konzentration von 0,5 Prom. löste nach 99 Minuten bei dem Versuchstiere zunächst Atembeschleunigung nebst Reizerscheinungen wie Lecken und Wischen der Schnauze aus; später wurde bei ruhigem Verhalten des Tieres die Atmung langsamer.

Hinsichtlich der Versuche *Lehmanns* mit den entsprechenden Konzentrationen gilt für H_2S das bei Gruppe II Gesagte (0,45 bis 0,47 Prom.). Für CS_2 mußte zum Vergleich die stärkste bei *Lehmann* angewandte Konzentration von 10,4 mg im Liter Luft herangezogen werden; es traten hierbei nach 90 Minuten Schwanken, nach 100 Minuten Seitenlage auf, in Übereinstimmung mit unseren Versuchsergebnissen. Als Nachwirkung gibt *Lehmann* bei CS_2 ziemlich rasche Erholung an; auch unser Versuchstier zeigte nach 30 Minuten keine Krankheitserscheinungen mehr.

Wie aus Gruppe IV zu ersehen, findet man bei Mischung beider Gase in den oben genannten Konzentrationen die Symptome der reinen CS_2-Wirkung fast unverändert wieder. Auch die Erholungszeit nach dem Versuche weist mit 30 bzw. 40 Minuten keinen wesentlichen Unterschied auf. Bei den stürmischen Erscheinungen der CS_2-Intoxikation kann die H_2S-Wirkung in der hier angewandten Konzentration und Dauer nicht zum Ausdruck kommen, zumal hier ja auch beide Gifte in derselben Richtung, nämlich reizend angreifen. Auch diese Versuchsgruppe zeigt, daß eine Potenzierung der Wirkung nicht stattgefunden hat.

In *Gruppe V* wurde dieselbe Konzentration der CS_2-Dämpfe sowohl einzeln als auch gemischt verwandt, wie bei Gruppe IV. Der CS_2-Einzelversuch ist der letztgenannten Gruppe entnommen und hier in Gruppe V noch einmal aufgeführt. Der H_2S-Gehalt betrug bei den Versuchen der Gruppe V 0,78 bzw. 0,70 Prom. bei einer Einwirkungs-

dauer von 110 Minuten. Es zeigten sich hierbei nur leichtere Symptome, wie Lecken der Schnauze, etwas Unruhe, mäßige Dyspnoe. Die Erholung ging rasch vonstatten. Von den zum Vergleich angeführten *Lehmann*schen Versuchen stimmen die beiden ersten mit unseren Ergebnissen insofern gut überein, als sich während der Dauer unseres H_2S-Versuches (110 Minuten) keine schweren Vergiftungserscheinungen zeigten. Das in dem dritten Versuch von *Lehmann* benutzte Tier scheint eine besonders starke Empfindlichkeit gegen H_2S besessen zu haben; denn schon nach 2 Minuten traten Wälzbewegungen und Nystagmus auf. Eine derartige Empfindlichkeit scheint jedoch aus dem Rahmen des Normalen herauszufallen, wie man sowohl auf Grund der übrigen Versuche *Lehmanns* als auch der unserigen schließen darf.

Vereinigt man CS_2-Dampf mit H_2S in der oben genannten Konzentration, so ergibt sich im Tierversuche fast genau die Kopie der reinen CS_2-Einwirkung. Eine potenzierte Wirkung konnte nicht beobachtet werden; trat doch im Gegenteil das Umsinken des Tieres fast $\frac{1}{4}$ Stunde später auf bei etwas höherer CS_2-Konzentration als im ungemischten CS_2-Versuche.

Von der Verwendung noch stärkerer Konzentrationen wurde abgesehen; denn es hätte jetzt sinngemäß die H_2S-Konzentration bei gleichbleibender CS_2-Konzentration erhöht werden müssen. Derartig hohe Konzentrationen rufen aber nach Versuchen von *Lehmann* (A. H. **14**, 160) fast augenblicklich schwerste Vergiftungserscheinungen hervor, sind also in Mischung mit anderen Gasen zur Beobachtung auf eine eventuelle potenzierte Wirkung nicht geeignet.

Vergleicht man die Ergebnisse aller fünf Versuchsgruppen, so geht daraus übereinstimmend hervor, daß eine potenzierte Wirkung von CS_2—H_2S-Gemischen gegenüber der Wirkung der unvermischten Gase nicht vorliegt. Die Frage, ob und wie sich die beiden Komponenten überhaupt beeinflussen, ist höchstens im Sinne einer Addition zu beantworten (Gruppe I und II). Bei Gruppe III ist eine Addition der Wirkungen wohl aus dem Grunde nicht wahrzunehmen, weil die stärkeren Reizerscheinungen des H_2S derart über eventuelle narkotische Einflüsse des CS_2 überwiegen, daß letztere in der Versuchszeit von 3 Stunden nicht zur Geltung kommen können. Dieses Bild ändert sich jedoch in Gruppe IV und V. Hier ist die Giftigkeit eines CS_2-Gehaltes von 13,1 bzw. 14,26 mg im Liter in der Zeit von 95 bis 111 Minuten ausschlaggebend; die Einwirkung einer H_2S-Konzentration von 0,5 bzw. 0,7 Prom. kommt hier nicht einmal hinsichtlich einer Addition der Giftwirkung in Frage, geschweige denn im Sinne einer Potenzierung.

Es bliebe noch die Frage zu beantworten, ob H_2S- und CS_2-Dämpfe in Mischung vielleicht Reaktionen miteinander eingehen, so

daß schließlich die Versuchstiere unter der Einwirkung der gemischten Gase ganz anderen Gasmengen als den berechneten ausgesetzt waren (oder überhaupt einem anderen aus der Reaktion resultierenden Körper).

Hierzu diente folgender Versuch:

In einer *Hempel*schen Bürette werden 150 ccm H_2S mit dem gleichen Volumen flüssigen Schwefelkohlenstoffs zusammengebracht. Unter Aufbrausen wird das H_2S-Volumen sofort bis auf wenige Kubikzentimeter reduziert. Der CS_2 riecht stark nach Schwefelwasserstoff und schwärzt im Augenblick ein darüber gehaltenes Bleiacetatpapier. Erwärmt man jetzt den CS_2 wenige Minuten lang vorsichtig bis zum Sieden, so ist danach kein H_2S-Geruch mehr wahrnehmbar, Bleiacetatpapier bleibt unverändert. Hieraus ergibt sich, daß es sich nur um eine Lösung des H_2S in CS_2 gehandelt hat und nicht um eine chemische Reaktion. Die Versuchstiere waren also in den Gasgemischen den sich gegenseitig nicht beeinflussenden Komponenten ausgesetzt, wie das auch aus den Ergebnissen hervorgeht.

Was den praktischen Nutzen der oben beschriebenen Untersuchungen anbetrifft, so zeigen sie uns, daß man beim Zusammentreffen von H_2S und CS_2 in industriellen Betrieben eine besondere toxische Wirkung des Gasgemisches nicht anzunehmen hat. Wie diese Verhältnisse bei Verwendung anderer in Fabrikbetrieben häufig vorkommender Gase oder Dämpfe liegen, läßt sich verallgemeinernd hieraus nicht schließen. Vielleicht gibt die vorliegende Arbeit Anregung zu weiteren experimentellen Studien auf diesem für die Gewerbehygiene wichtigen Gebiete.

Autorenverzeichnis.